



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

Dipartimento di Scienze Ambientali

Dottorato di ricerca in Evoluzione Biologica e Biochimica – XXI Ciclo

**Caratterizzazione di laccasi native e modificate
e loro uso nella degradazione di coloranti**

settore scientifico-disciplinare BIO/10

Coordinatore:

Prof. Federico Federici

Tutor:

Prof. Vincenzo Buonocore

Dottorando:

Federica Silvestri



UNIVERSITY OF TUSCIA - VITERBO

Environmental Sciences Department

PhD Course in Biological and Biochemical Evolution – XXI cycle

Characterization of native and modified laccases and they use in the degradation of dyes

scientific-disciplinary field BIO/10

Coordinator:

Prof. Federico Federici

Tutor:

Prof. Vincenzo Buonocore

Ph.D. Student:

Federica Silvestri

INDICE

pp

RINGRAZIAMENTI.....	8
ABSTRACT.....	9
1 - SCOPO DELLA TESI.....	13
2 - INTRODUZIONE	
2.1 LE LACCASI: CARATTERISTICHE GENERALI.....	15
2.1.1 Origine e distribuzione.....	15
2.1.2 Funzione e struttura.....	15
2.1.3 Ruolo fisiologico in natura.....	22
2.2 PRODUZIONE DI LACCASI IN FUNGHI BASIDIOMICETI.....	25
2.2.1 Laccasi del fungo <i>Trametes trogii</i>	28
2.3 APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE DELLE LACCASI.....	29
2.4 I COLORANTI.....	33
2.4.1 Storia dei coloranti.....	33
2.4.2 Classificazione.....	34
2.4.3 Utilizzi e svantaggi.....	38
2.4.4 Metodi di rimozione.....	39
2.4.5 Utilizzo delle laccasi per la decolorazione.....	40
2.5 ESPRESSIONE ETEROLOGA.....	42
2.5.1 Espressione in <i>Pichia Pastoris</i>	45
2.6 EVOLUZIONE DIRETTA.....	48
2.7 MUTAGENESI SITO-DIRETTA.....	50

3 - MATERIALI E METODI

3.1 COLTURA DEL FUNGO <i>TRAMETES TROGII</i>	54
3.1.1 <i>Trametes trogii</i>	54
3.1.2 Terreni e condizioni colturali	54
3.2 ESPRESSIONE ETEROLOGA	55
3.2.1 MICRORGANISMI E CONDIZIONI DI CRESCITA	55
3.2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	55
3.2.1.2 <i>Pichia pastoris</i>	55
3.2.2 VETTORI DI ESPRESSIONE	57
3.2.3 TECNICHE DEL DNA RICOMBINANTE	58
3.2.3.1 Manipolazione del DNA	58
3.2.3.2 Clonaggio del gene <i>lcc2</i>	58
3.2.3.3 Amplificazione dell'intera sequenza del gene <i>lcc2</i>	59
3.2.3.4 Mutagenesi sito-diretta	60
3.2.3.5 Clonaggio nei vettori di espressione	60
3.2.3.6 Preparazione delle cellule competenti e trasformazione di <i>E. coli</i> DH5 α	61
3.2.3.7 Estrazione e purificazione del DNA plasmidico da <i>E. coli</i>	62
3.2.4 TRASFORMAZIONE DI <i>PICHIA PASTORIS</i>	62
3.2.4.1 Preparazione delle cellule elettrocompetenti e trasformazione	62
3.2.4.2 Screening dei trasformanti di lievito	63
3.2.4.3 Estrazione e purificazione del DNA plasmidico da <i>P. pastoris</i>	63
3.2.5 ESPERIMENTI IN FERMENTATORE	64
3.2.5.1 Fermentatore	64
3.2.5.2 Prove di fermentazione con ceppi ricombinanti di <i>P. pastoris</i>	66
3.2.5.3 Determinazione della biomassa, dell'attività laccasica e del contenuto proteico	68

3.3 ANALISI BIOCHIMICA E MOLECOLARE DELLE LACCASI PRODOTTE DAL FUNGO <i>T.TROGII</i> E DELLE LACCASI RICOMBINANTI.....	68
3.3.1 PURIFICAZIONE DEGLI ENZIMI.....	68
3.3.1.1 Cromatografia in batch di scambio ionico.....	68
3.3.1.2 Cromatografia di scambio ionico su colonna.....	68
3.3.1.3 Cromatografia di interazione idrofobica.....	69
3.3.2 CARATTERIZZAZIONE DEGLI ENZIMI.....	70
3.3.2.1 Dosaggio di attività enzimatica.....	70
3.3.2.2 Dosaggio proteico.....	70
3.3.2.3 Curva di attività in funzione del pH.....	71
3.3.2.4 Attività in presenza di alogenuri.....	71
3.3.2.5 Determinazione delle costanti cinetiche.....	71
3.3.2.6 Elettroforesi su gel di poliacrilammide.....	72
 3.4 ANALISI FILOGENETICA.....	 72
 3.5 PROVE DI DEGRADAZIONE.....	 73
3.5.1 Immobilizzazione dell'enzima.....	73
3.5.2 Prove di degradazione di composti fenolici.....	73
3.5.3 Prove di degradazione di coloranti con enzima immobilizzato.....	74
3.5.4 Analisi con HPLC	75
3.5.5 Prove di decolorazione in "Microtiter Plate"	75
 3.6 OTTIMIZZAZIONE DELLA DECOLORAZIONE CON IL METODO RSM.....	 77
 3.7 MODELING DI LCC2.....	 78

4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 PRODUZIONE DI LACCASI NATIVE E MODIFICATE.....	79
4.1.1 PURIFICAZIONE DELLE ISOFORME LACCASICHE DI <i>TRAMETES TROGII</i>	79
4.1.1.1 Caratterizzazione delle isoforme.....	81
4.1.2 ISOLAMENTO E CLONAGGIO DEL GENE <i>lcc2</i> E CARATTERIZZAZIONE DEL SUO PRODOTTO.....	83
4.1.2.1 Clonaggio del gene <i>lcc2</i> in <i>T. trogii</i> 201.....	83
4.1.2.2 Espressione del gene <i>lcc2</i> in <i>P. pastoris</i>	86
4.1.2.3 Analisi filogenetica.....	86
4.1.2.4 Proprietà fisico-chimiche e parametri cinetici.....	88
4.1.2.5 Struttura tridimensionale di Lcc2.....	91
4.1.3 PRODUZIONE DI MUTANTI DEL GENE <i>lcc1</i>	95
4.1.3.1 Mutagenesi del gene <i>lcc1</i>	95
4.1.3.2 Espressione dei geni mutati in <i>Pichia Pastoris</i>	96
4.1.3.3 Purificazione dei mutanti.....	99
4.1.3.4 Caratterizzazione dei mutanti.....	99
4.1.3.4.1 Gel in condizioni native.....	99
4.1.3.4.2 Curve di attività in funzione del pH.....	100
4.1.3.4.3 Costanti cinetiche.....	103
4.2 PROVE DI DEGRADAZIONE.....	105
4.2.1 Prove di degradazione di composti fenolici con Lcc1 di <i>T. trogii</i> immobilizzata.....	105
4.2.2 Prove di degradazione di coloranti con Lcc1 di <i>T. trogii</i> immobilizzata.....	108
4.2.3 Prove di decolorazione in “Microtiter Plate”.....	110
4.2.4 Ottimizzazione del processo di decolorazione con Lcc1 di <i>T. trogii</i>	115
4.2.4.1 Ottimizzazione per il colorante amaranto.....	116
4.2.4.2 Ottimizzazione per il colorante remazol brilliant blue R.....	126

5 – CONCLUSIONI.....	129
6 – BIBLIOGRAFIA.....	133
7 – PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONVEGNI.....	148

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questa bellissima esperienza vorrei ringraziare innanzitutto il prof. Vincenzo Buonocore per la disponibilità e la grande competenza con cui mi ha guidata.

Ringrazio la prof.ssa Anna Maria Vittoria Garzillo per la disponibilità e per i preziosi consigli elargiti.

Ringrazio il prof. Maurizio Ruzzi per la disponibilità e per i validi ed utili consigli nel lavoro d'espressione eterologa.

Ringrazio la dott.ssa Maria Chiara Colao che mi ha seguita e consigliata in questa esperienza e mi è stata vicina come una vera amica.

Vorrei infine ringraziare la mia famiglia e tutti i miei amici per il sostegno e l'affetto che mi hanno dato.

Federica

ABSTRACT

Laccases (benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) belong to the family of “multicopper oxidases”. Laccases were discovered in plants, then have been described in fungi, insects and, more recently, in prokaryotes. They are thought to be nearly ubiquitous among fungi, mainly in the wood-rotting basidiomycetes causing white-rot, where they are usually produced in multiple isoforms as extracellular proteins. Laccases are involved in several physiological functions, such as lignin biosynthesis, plant pathogenesis, insect sclerotisation, and degradation of lignocellulosic materials. The cultural broth of laccase-producing fungi contains generally a main laccase and a number of isoforms some of which closely related, others differing for structural and catalytic properties. The production of different isoenzymes is due to the occurrence of multiple laccase genes; it is known that the expression of some of these genes is regulated up by the presence in the culture medium of specific inducers such as copper, ferulic acid or 2,5-xylidine.

Most fungal laccases are monomeric glycoproteins with molecular masses ranging between 60,000 and 70,000 Da and the extent of glycosylation between 10 and 25%; they catalyze the one-electron oxidation of a large variety of substrates (usually diphenols or aromatic amines) coupled with the reduction of dioxygen to two molecules of water. In the blue laccases, the redox process is brought about by four copper ions arranged in three different centres. One type-1 (T1) copper ion is characterized by a strong absorption nearly 600 nm which is responsible of the intense blue colour of these proteins; T1 copper shows a trigonal coordination, with two histidine and a cysteine residues as conserved ligands; either a leucine or a phenylalanine residue occupies the fourth ligand position in fungal laccases. The coordination geometry and ligand nature of T1 copper might be responsible of the high redox potential of fungal laccases, as compared to plant laccases and other blue copper oxidases. A second copper ion, coded as type-2 (T2), has a weak absorption in the visible region, is electron paramagnetic resonance (EPR)-active and is coordinated by two histidine residues. The last two copper ions [type-3, (T3)] form a binuclear centre characterized by an absorption at 330 nm; they are EPR-silent due to an antiferromagnetic coupling mediated by a hydroxyl bridge. The two T3 copper ions are coordinated by six histidine residues and are positioned close to the T2 copper ion to form a trinuclear cluster. T1 copper is the site where the substrate oxidation occurs; the extracted electrons are transferred, probably through a strongly conserved HisCysHis tripeptide motif, to the T2T3 trinuclear cluster, where dioxygen is reduced to water.

Laccase are very versatile enzymes, being able to oxidize an extensive list of aromatic compounds containing hydroxy or amino groups, including pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and dyes. Further, the presence of small molecular weight redox mediators such as 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), violuric acid (VA) and 1-hydroxybenzotriazole (1-HBT), enhances the range and the rates of compounds to be oxidized (including recalcitrant dyes). These properties make laccases good candidates for applications in the pulp and paper industry, textile industry, biosensor development, bioremediation of polluted water and soil. The great interest that laccases aroused for biotechnological uses has promoted intense investigations for clarifying their oxidative mechanism and for discovering new enzymes with desirable characteristics and the molecular determinants able to modulate enzyme properties for specific applications. For many applications it is important to find an enzyme that is thermostable and works at relatively high pH-value.

The objective of this thesis is the characterization of native and modified laccases for biotechnological applications, as dye decolourization. To such aim, three main ways have been continuations: characterization of native laccases secreted from the fungus basidiomycete *Trametes trogii*; isolation and expression of new *T. trogii* laccase genes; production and characterization of mutants of the main *T. trogii* laccase.

Trametes trogii, a typical basidiomycete, produces at least five laccase isoforms; the main isozyme, coded as Lcc1, has been purified and characterized. It could be of interest to analyze role and properties of the other isoforms, but their purification and characterization is time-consuming since they account altogether for less than 10% of the total laccase activity. However, two *T. trogii* laccase isoforms (coded as P5 and P6) have been partially purified and characterized in comparison to Lcc1; in particular the profile pH/activity show that P6 has an optimal activity shifted toward neutrality for phenolic substrates (about 0.5 and 1.0 pH units for DMP and guaiacol, respectively, as compared to Lcc1)

To find easier ways to produce laccase isoforms, we have looked for new laccase-encoding genes in the *T. trogii* cDNA using degenerate primers designed on conserved regions of basidiomycete laccases; a laccase gene, coded as *lcc2*, has been isolated, cloned, sequenced and expressed in the heterologous host *Pichia pastoris*. The product of *lcc2* (Lcc2) has an interesting behaviour towards aromatic substrates exhibiting an optimal pH closer to the neutrality than Lcc1; in particular Lcc2 shows a shift towards higher pH values, as compared to Lcc1, of 2.0 and 1.0 units for DMP and guaiacol, respectively. It is worthwhile to note that the whole pH/activity profile of Lcc2 with phenolic substrates appears shifted towards values closer to neutrality, so that the enzyme conserves about 40% of its activity at

pH 6. Finally, at the optimum pH, Lcc2 shows a higher affinity (lower K_m values) towards the phenolic substrates, as compared to Lcc1.

The three-dimensional structure of Lcc1 laccase from *T. trogii* was used as a template for the construction of the Lcc2 model. Lcc2 shows a substrate cavity very similar to those of the so far laccases crystallized; the aspartic acid residue is conserved and is very close to the histidine residue. A main difference is observed between Lcc1 and Lcc2 with regard to two spatially close residues surrounding the substrate cavity: Thr 164 and Ser 264 of Lcc1 are replaced in Lcc2 by the two hydrophobic residues Phe 163 and Ile 265, respectively. This variation affects in same way the capacity of Lcc2 to interact with ligands.

The catalytic efficiency of Lcc2 towards bulky ligands carrying polar groups (e.g. ABTS) decreases significantly due to both an increase in K_m and a decrease in k_{cat} , indicating a concomitant decrease in the affinity for the substrate and in the kinetics of electron transfer. Conversely, the catalytic efficiency of Lcc2 towards small hydrophobic substrates (e.g. guaiacol, DMP) shows a moderate decrease as compared to Lcc1, due to an about 5-fold increase in the affinity for the substrates and to a more sensible decrease in k_{cat} (Table 1). The increase in affinity of Lcc2, as compared to Lcc1, towards hydrophobic ligands which are embedded in the substrate cavity could be due to an induced-fit closing movement of the cavity led by the amino acid residues of the border loops closer to the ligand. The decrease in k_{cat} observed in Lcc2, as compared to Lcc1, indicates that the electron transfer from the substrate to the T1 copper, being the rate-limiting step in laccase kinetics, must have been affected by the structural differences existing between the two laccase isoforms; however, it cannot be excluded that the internal electron transfer from the T1 copper to the T2T3 trinuclear cluster and then to the dioxygen molecule and the product release have been affected.

Laccase biotransformation of xenobiotics in natural media suffers from two main limitations of the enzyme: an acidic optimal pH for activity and the requirement in several cases for a redox mediator. The modification of these laccase properties should be achieved through a site-directed mutagenesis strategy. On the basis of previous structural analyses of the amino acid residues surrounding the active site of the laccase IIIb from *T. versicolor*, it was suggested that the histidine in position 458, that also coordinate the T1 copper, acts as the primary electron acceptor from the substrate, and the aspartate in position 205 is hydrogen bonded via the terminal oxygen of its side chain to the reducing substrate and influence the dependence of the activity towards pH. In addition it was observed that this acidic residue is highly conserved among fungal laccases and is expected to play an important role in the structure and function of the enzyme. In the current study the Asp205 of Lcc1 from *T. trogii*

was mutated in amino acids with different chemical properties: Ser or Cys, non charged polar residues, Lys, a positively charged residue. The pH/activity profiles of the mutated laccases with phenolic substrates indicated a shift of the optimal pH towards neutrality while maintaining the characteristic bell shape curve. However, it is important to note that the specific activity of the tested mutants was significantly lower than that of the wild type at all pH levels and the catalytic improvement at pH closer to neutrality could be associated with a much reduced efficiency at acidic values of pH. The presence of a negatively charged residue close to the substrate binding pocket could stabilize the radical cation formed following electron subtraction and the absence of the Asp205 residue determined a significant decrease in the specific activity of the mutated enzymes.

Degradation experiments of phenolic compounds and of a number of dyes with free and immobilized Lcc1 have shown that this laccase has a wide oxidizing capacity; many recalcitrant compounds may be degraded in the presence of an appropriate mediator. Preliminary screening experiments of decolourization on microtiter plates have been carried out on various structurally different dyes: azo (amaranth, carmoisine, new coccine, sunset yellow), anthraquinonic (remazol brilliant blue R), triarylmethane (patent blue) and indigoid (indigo). Finally, the process of decolourization has been optimized for amaranth and remazol brilliant blue R by the response surface methodology (RSM) which allows the monitoring at the same time of a number of variables (enzyme, substrate and mediator concentration, time, pH). These experiments have shown that it is possible to modulate experimental conditions as suitable to reach optimal results; in particular, it is possible to operate at pH closer to neutrality at appropriate mediator concentrations or at low mediator levels by modulating enzyme concentration and/or the time of the process.

1 - SCOPO DELLA TESI

Trametes trogii, come altri funghi *white-rot*, rilascia nel terreno di coltura diverse isoforme di laccasi la cui molteplicità dipende non soltanto da meccanismi di maturazione post-traduzionali, ma soprattutto dalla presenza di più geni per laccasi che, spesso, sono differenzialmente regolati.

La capacità della laccasi di ossidare un'ampia varietà di composti fenolici e ammine aromatiche rende il loro utilizzo particolarmente versatile in diverse applicazioni industriali. L'interesse del mondo scientifico nei confronti dei processi biotecnologici riflette la crescente consapevolezza di cercare soluzioni economicamente ed ambientalmente sostenibili per lo smaltimento degli scarichi civili ed industriali. Tra le diverse potenziali applicazioni, le vie enzimatiche di decolorazione dei reflui emergono come processi alternativi ai classici metodi di rimozione chimico-fisica spesso poco efficienti e costosi.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di individuare e caratterizzare laccasi native o modificate per applicazioni biotecnologiche, in particolare per i processi di decolorazione.

A tal fine sono state seguite tre vie principali:

- **Purificazione e caratterizzazione di laccasi prodotte dal fungo basidiomicete *T. trogii*:** Sono state individuate almeno sei diverse isoforme di cui la principale (Lcc1) costituisce il 90% dell'attività laccasica. Sono state analizzate caratteristiche, quali la dipendenza dell'attività dal pH con 2 substrati di tipo fenolico (DMP e guaiacolo) e uno non fenolico (ABTS), di Lcc1 e di alcune isoforme secondarie.
- **Isolamento, clonaggio e caratterizzazione del gene *lcc2*:** Sempre con lo scopo di trovare enzimi con caratteristiche interessanti, sono stati isolati da *T. trogii* nuovi geni laccasici; uno dei quali, *lcc2*, è stato espresso in *Pichia pastoris* e la proteina ricombinante ottenuta è stata caratterizzata. Dedotta la struttura primaria dalla sequenza genica di *lcc2*, ne è stato costruito un modello 3-D sulla base delle coordinate tridimensionali della laccasi omologa di *T. trogii* Lcc1 e si sono messe in relazione variazioni strutturali con le diverse caratteristiche chimico-fisiche delle due isoforme.

- **Produzione e caratterizzazione di mutanti del gene *lcc1*:** Sono stati progettati esperimenti di mutagenesi sito-diretta a carico dell'Asp205 che potrebbe influire sul pH ottimale dell'enzima. Sono state poi effettuate delle analisi comparative per valutare eventuali modifiche delle caratteristiche catalitiche della Lcc1 ricombinante e delle laccasi mutate rispetto a quelle della Lcc1 nativa.

Infine sono state effettuate **prove di degradazione di composti fenolici e di coloranti** al fine di individuare i prodotti facilmente modificati dall'enzima, quelli che richiedono la presenza di mediatore, e le condizioni sperimentali ottimali per i processi di degradazione. Si è utilizzata la laccasi maggioritaria Lcc1 di *T. trogii*, in forma libera e immobilizzata, sono state effettuate prove di decolorazione in microtiter su coloranti appartenenti a diverse classi: azoici (amaranto, carmoisina, new coccine, sunset yellow), antrachinonici (remazol brilliant blue R), triarilmetano (patent blue) e indigoidi (indigo) e si è ottimizzato il processo di decolorazione su due coloranti appartenenti alle due principali classi di coloranti utilizzate dall'industria tessile.

2 - INTRODUZIONE

2.1 LE LACCASI: CARATTERISTICHE GENERALI

2.1.1 Origine e distribuzione

Le laccasi (benzenediolo:ossigeno ossidoreduttasi; EC 1.10.3.2) sono enzimi ampiamente distribuiti in natura. Appartengono alla famiglia delle ossidasi blu contenenti rame che comprende anche l'ascorbato ossidasi delle piante e la ceruloplasmina dei mammiferi (Messerschmidt e Huber, 1990).

Il nome di questa proteina deriva dalla specie vegetale dalla quale fu isolata per la prima volta nel 1883, l'albero giapponese della lacca, *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883). Da allora le laccasi sono state trovate in piante superiori (Mayer, 1979), batteri (Diamantidis et al., 2000), ed insetti (Hopkins, 1992), anche se la fonte più rappresentativa rimangono i funghi, in particolare i basidiomiceti *white-rot* i quali producono diverse isoforme di queste proteine.

Le laccasi sono *p*-difenolossidasi che catalizzano l'ossidazione di numerosi composti aromatici, in particolare fenoli, con la concomitante riduzione di ossigeno molecolare ad acqua, mediante il trasferimento di quattro elettroni.

2.1.2 Funzione e struttura

La maggior parte delle laccasi contengono quattro atomi di rame per unità funzionale, indispensabili per l'attività catalitica. Gli atomi di rame sono distribuiti in diversi siti di legame e sono classificati in tre tipi a seconda delle specifiche caratteristiche spettroscopiche e funzionali. Il rame di tipo 1 presenta un'intensa banda di assorbimento nello spettro visibile a circa 600 nm, dovuta al legame covalente tra rame e cisteina, e conferisce il caratteristico colore blu alle ossidasi multirame (Nakamura, 1958; Malmstrom et al., 1968); è proprio a livello del sito 1 che si realizza l'ossidazione del substrato. Un'importante caratteristica che differenzia le laccasi fungine da quelle vegetali e che le rende particolarmente interessanti nel settore delle biotecnologie è proprio il potenziale redox del rame di tipo 1, che nelle laccasi di *Rhus vernicifera* e nell'ascorbato ossidasi è di circa 330-400 mV. Le laccasi fungine invece presentano valori di potenziale redox generalmente più elevati, compresi tra 500 e 900 mV e questa differenza viene attribuita alle caratteristiche dell'ambiente di coordinazione dello ione rame di tipo 1 (Andreasson e Reinhammar, 1976).

Il rame di tipo 1 presenta una geometria distorta bipiramidale trigonale con una posizione assiale vacante disponibile per il substrato (Fig. 2.1). Le posizioni equatoriali sono impegnate con legami di coordinazione con due istidine ed una cisteina, mentre la quarta può essere variabile. Questo ligando è una metionina nelle laccasi batteriche e nell'ascorbato ossidasi vegetale, mentre è leucina o fenilalanina in quelle fungine. La geometria di coordinazione e la natura dei ligandi del rame T1 potrebbero essere responsabili dell'alto potenziale ossidoriduttivo delle laccasi fungine, rispetto a quello delle laccasi delle piante e di altre ossidasi rame blu. Il rame di tipo 2, invece, non è rilevabile nello spettro visibile ma presenta proprietà paramagnetiche se analizzato tramite spettroscopia EPR ed è coordinato da due residui di istidina. I due ioni rame di tipo 3 sono organizzati in un centro binucleare caratterizzato da una banda di assorbimento a 330 nm (nella forma ossidata) e dall'assenza di segnale EPR poiché sono fortemente accoppiati e legati a ponte da un ossidrile. I due ioni rame T3 sono coordinati da sei residui d'istidina e sono posizionati vicino allo ione rame del centro T2 per formare un cluster trinucleare a livello del quale si realizza la riduzione dell'ossigeno molecolare ed il rilascio di acqua.

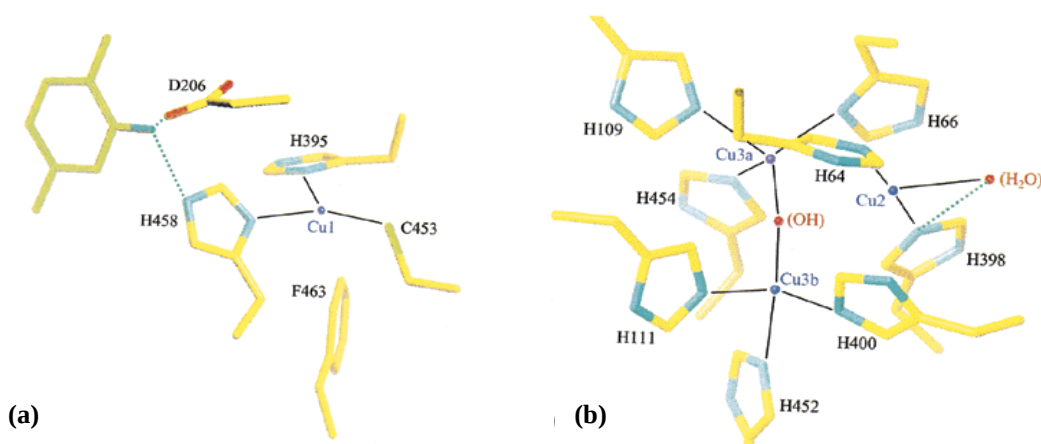


Figura 2.1 - Siti di legame del rame nella laccasi LacIIB di *Trametes versicolor* e loro ambiente di coordinazione; (a) rame di tipo1, (b) cluster trinucleare.

Per quanto riguarda il trasferimento degli elettroni dal centro mononucleare T1, dove si ha l'ossidazione del substrato, al centro trinucleare T2/T3, è stato proposto un percorso formato da residui di istidina (His) che formano legami di coordinazione con gli ioni rame del centro 3 e da residui di cisteina (Cys) formanti legami con lo ione rame del centro 1 (Reinhammar,1997). Tuttavia il trasferimento dei singoli elettroni al centro 3 non avviene finché gli ioni rame dei centri 1 e 2 non vengono ridotti entrambi, dato che il centro 3 è l'accettore cooperativo degli elettroni trasferiti (Fig 2.2).

Nella laccasi la riduzione dell'ossigeno ad acqua è conseguente alla ossidazione di un substrato fenolico dal quale si genera un radicale catione instabile (Fig. 2.3). L'azione ossidativa può proseguire a carico dei derivati fenolici risultanti dai riarrangiamenti molecolari per dare, a secondo delle condizioni, composti di natura chinonica, e quindi molecole a basso peso molecolare o prodotti di polimerizzazione ligninosimili.

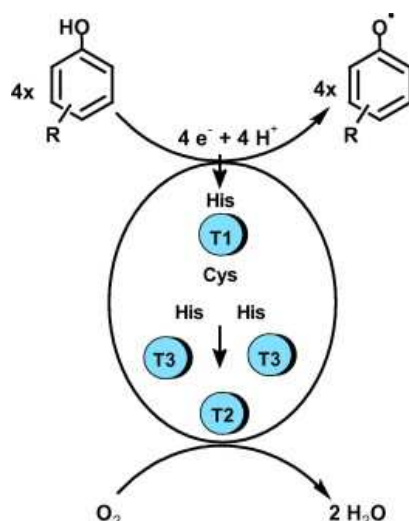


Figura 2.2 – Ciclo catalitico delle laccasi

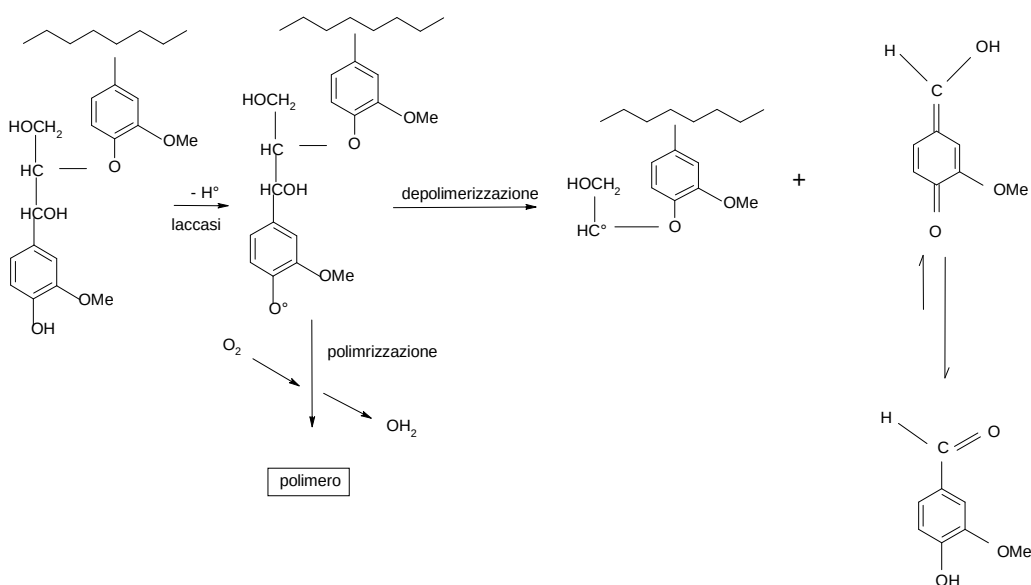


Figura 2.3 - Meccanismo di ossidazione radicalica catalizzata dalla laccasi nella direzione della depolimerizzazione o nella direzione della polimerizzazione.

Definire le laccasi in base al loro substrato non è semplice, innanzitutto perché l'insieme dei composti ossidati da questo enzima si sovrappone in parte con quello di un altro tipo di

ossidasi, la tirosinasi, che è una monofenolo monossigenasi. Grazie alla bassa specificità di substrato le laccasi sono enzimi molto versatili; in particolare catalizzano l'ossidazione di para-difenoli, polifenoli, metossifenoli, amminofenoli, diammine, poliammine, arilammine, etc., compresi pesticidi, idrocarburi policiclici aromatici, coloranti. e anche di alcuni ioni inorganici (es. Mn^{2+} e I^-), ma non è in grado di ossidare la tirosina [Rodriguez Couto et al., 2006]. Inoltre è stato osservato che substrati della laccasi, come l'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS), 1-idrossibenzotriazolo (HBT) o acido violurico (VA), possono agire da mediatori velocizzando notevolmente la reazione catalitica su diversi substrati e rendendo possibile l'ossidazione di composti che altrimenti non sarebbero substrato di questo enzima. (Li et al.,1999; Johannes et al.,2000). Infatti, la laccasi da sola non potrebbe ossidare i residui non fenolici a causa del basso potenziale redox, o quelli di grandi dimensioni, incapaci di entrare nella cavità catalitica (Banci et al., 1999; D'Acunzo et al., 2002; Crestini et al., 2003). Generalmente un mediatore agisce come un trasportatore di elettroni (Fig. 2.4) che, dopo essere stato ossidato dall'enzima, si diffonde a partire dal sito attivo per ossidare il substrato. In più, la forma ossidata del mediatore (Med_{ox}), essendo strutturalmente diversa dall'enzima, potrebbe contare su un meccanismo differente di ossidazione, e quindi estendere la gamma dei substrati suscettibili all'azione enzimatica (Fabbrini et al., 2002a). E' stato osservato che un mediatore redox, ossidato dalla laccasi, può a sua volta ossidare un altro substrato sottraendogli un elettrone e generando un radicale catione (Bourbonnais et al., 1998; Xu et al., 2000, 2001); oppure può estrarre un protone dal substrato convertendolo in un radicale (Li et al., 1998; Fabbrini et al., 2002a). Per esempio l'ABTS agisce secondo il primo meccanismo (Muheim et al., 1992; Potthast et al., 2001), mentre l'HBT segue il secondo meccanismo (Fabbrini et al., 2002b).

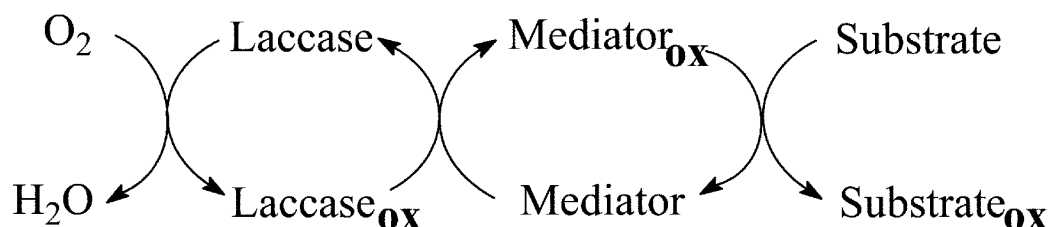


Figura 2.4 – Rappresentazione schematica del ruolo del mediatore nella degradazione dei substrati da parte delle laccasi.

La maggior parte delle laccasi sono proteine monomeriche caratterizzate da un peso molecolare compreso tra 60000 e 80000, ma sono stati descritti anche multimeri come l'isoenzima I di *Podospora anserina* (Durrens, 1981) o quello di *Agaricus bisporus* (Wood, 1980) e *T. villosa* (Yaver et al., 1996). Generalmente le laccasi sono glicoproteine esocellulari e gli enzimi fungini hanno un grado di glicosilazione inferiore (10-25%) rispetto a quelli di origine vegetale (24-45%). In alcuni casi la stessa catena polipeptidica può essere glicosilata in modo differente sia per contenuto di carboidrati che per tipo di zuccheri; questo fenomeno genera eterogeneità nel peso molecolare e nel punto isoelettrico degli enzimi secreti. Vi sono tuttavia due caratteristiche fondamentali comuni nella porzione glicosidica della maggior parte delle laccasi: un elevato contenuto in mannosio e legami di tipo N-glicosidico alla proteina. La porzione glucidica non è indispensabile né per la secrezione né per l'attività catalitica, ma le proteine che ne sono prive sono più suscettibili all'attacco da parte di proteasi e all'effetto della temperatura (Yhoshitake et al., 1993).

Negli ultimi anni sono state pubblicate numerose sequenze di geni che codificano per laccasi fungine. La prima sequenza pubblicata è stata quella della laccasi del fungo ascomicete *Neurospora crassa*; successivamente sono state caratterizzate quelle di molti basidiomiceti "white-rot" (ad esempio quelli del genere *Trametes*), di alcuni funghi patogeni per le piante e di ascomiceti filamentosi (Thurston, 1994). In molti casi queste sequenze sono parte di famiglie geniche, costituite da diverse varianti non alleliche, indicando che almeno una parte della molteplicità di isoforme prodotte da diverse specie fungine può essere attribuita alla presenza di numerosi geni che codificano per laccasi. Dall'analisi delle sequenze di cDNA si è potuto vedere che i geni per le laccasi codificano per un polipeptide di circa 520-600 aminoacidi, che comprende un peptide segnale all'estremità N-terminale fondamentale per la secrezione. Comparando le sequenze geniche si è inoltre visto che il numero e la posizione degli introni (solitamente 10-11) sono abbastanza conservati (Smith et al., 1998). L'analisi delle sequenze proteiche dedotte mostra che le regioni che legano il rame sono molto conservate, anche rispetto ad altre ossidasi blu, indicando che questi enzimi sono molto antichi da un punto di vista evolutivo. Le laccasi sono quindi prodotte da una famiglia di geni che codificano per diversi isoenzimi con strutture primarie simili ma con differenti caratteristiche chimico-fisiche. Le forme isoenzimatiche meno abbondanti sono spesso espresse o trascritte in risposta a diverse condizioni di coltura e alla presenza di induttori di varia natura (Yaver et al., 1996; Dittmer, et al., 1997), quali rame, composti fenolici o aromatici in genere derivati della lignina (come acido ferulico e acido paraidrossibenzoico); tra questi composti hanno particolare influenza l'acido p-cumarico, la vanillina, il pirocatecolo e l'acido diidrossibenzoico (Rogalski et al., 1991; Terron et al., 2004).

La tecnica della cristallografia a raggi X ha permesso di determinare la struttura tridimensionale di alcune laccasi e contemporaneamente di confermare le ipotesi riguardo la loro struttura molecolare.

Negli ultimi anni, sono state descritte le strutture tridimensionali di numerose laccasi fungine: *Coprinus cinereus* (in una forma priva del rame T2) (Ducros et al., 2001), *Trametes versicolor* (Bertrand et al., 2002; Piontek et al., 2002), *Pycnoporus cinnabarinus* (Antorini et al., 2002), *Melanocarpus albomyces* (Hakulinen et al., 2002) e *Rigidoporus lignosus* (Garavaglia et al., 2004); a queste si aggiunge la struttura tridimensionale pubblicata da Enguita et al. (2004) della laccasi dalle endospore di *Bacillus subtilis*, cristallizzate in presenza di ABTS. Di recente, è stata determinata anche la struttura cristallina della principale isoforma laccasica di *Trametes trogii* (Lcc1) da Matera et al. (2008). Malgrado le loro origini differenti e l'assenza, in un caso, di uno ione rame essenziale per l'attività enzimatica (Ducros et al., 2001), la struttura generale delle laccasi cristallizzate è molto simile. La laccasi prodotta dal fungo *Coprinus cinereus* cristallizzata da Ducros et al. (2001) mostra che in questa forma la proteina presenta la caratteristica organizzazione a tre domini, ma essendo priva del rame di tipo 2 è cataliticamente inattiva.

Uno dei maggiori ostacoli per l'ottenimento di cristalli della laccasi in forma attiva è rappresentato dall'estesa microeterogeneità presumibilmente dovuta al diverso grado di glicosilazione della proteina. Il primo lavoro che descrive l'intero assetto di coordinazione di tutti e quattro i centri rame in un cristallo dell'enzima attivo è quello di Piontek et al. (2002) che descrive, ancora una volta, la laccasi come un monomero organizzato in tre domini arrangiati sequenzialmente, ciascuno dei quali mostra un'architettura di tipo β a barile molto simile a quella osservata per l'azzurina e la plastocianina. Il dominio 1 comprende quattro foglietti β e quattro eliche 310, tre di quest'ultime sono situate tra i peptidi di connessione dei foglietti β , mentre una è presente tra il dominio 1 e il dominio 2. Il secondo dominio ha due foglietti β : uno ripiegato sei volte e un secondo ripiegato cinque volte; inoltre, come nel dominio 1, si ritrovano tre eliche 310 nei peptidi che connettono sia i singoli foglietti β sia i domini 1 e 3 rispettivamente. Ancora un'elica 310, tra il secondo e il terzo dominio, forma una parte della loop region che si estende per quaranta residui amminoacidici. Il terzo dominio, infine, consiste di una struttura β a foglietto ripiegato che insieme ad un' α -elica e ad un β -turn forma la cavità entro la quale è accolto il rame di tipo 1. Il cluster trinucleare T2T3 è compreso tra i domini 1 e 3. La porzione C-terminale del dominio 3 con tre motivi ad α -elica completa la struttura. Un primo ponte disolfuro nel dominio 1 coinvolge le due cisteine 85 e 488 ed un secondo tra la cisteina in posizione 117 e la cisteina 205 connette il dominio 1 con il dominio 2 (Fig.2.5).

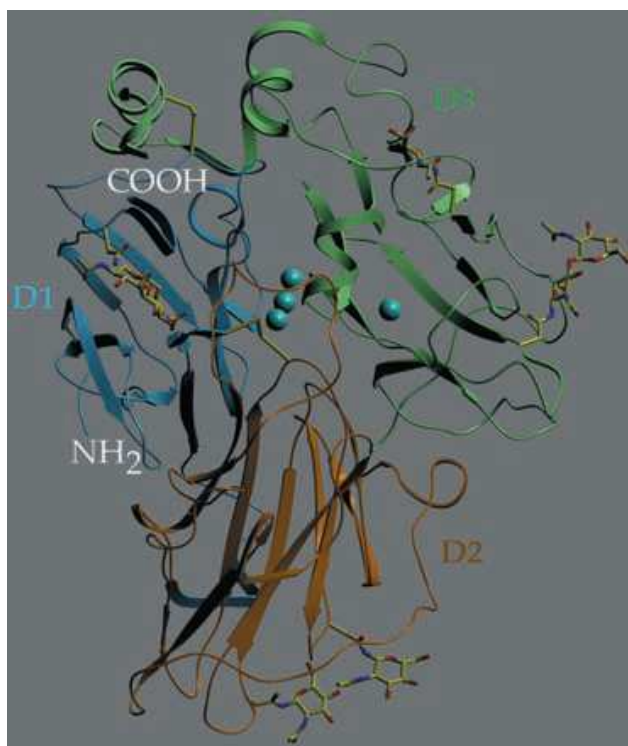


Figura 2.5 - Struttura tridimensionale della laccasi da *Trametes versicolor*.

Il confronto dei singoli domini con altre strutture note di proteine contenenti rame conferma essenzialmente la stessa topologia.

La laccasi prodotta dal fungo ascomicete *Melanocarpus albomyces* è stata cristallizzata con una risoluzione di 2,4 Å (Hakulinen et al. 2002). Anche in questo caso è stato possibile mantenere tutti e quattro gli ioni rame. La proteina è altamente glicosilata e nella sua struttura ritorna il motivo a tre domini presente anche nella laccasi di *Coprinus cinereus*, tuttavia vi sono differenze significative nei loops che formano il sito di legame per il substrato. Per di più la struttura del cristallo ha messo in evidenza una diffusa densità elettronica tra tutti e tre gli ioni rame presenti nel sito trinucleare, suggerendo che una molecola di ossigeno possa legarsi con una nuova geometria. Questo ossigeno, richiesto nella reazione catalizzata dall'enzima, può arrivare al sito trinucleare attraverso un tunnel che si crea nella struttura e che è aperto nella laccasi di *Coprinus cinereus*. Il C-terminale nella laccasi di *Melanocarpus albomyces* invece forma una sorta di tappo che blocca questo accesso, in modo da rendere necessario un cambiamento conformazionale per permettere l'ingresso dell'ossigeno (Hakulinen et al., 2002).

Gli studi a raggi X di laccasi rivelano un'architettura molecolare comune a queste proteine, caratterizzata da tre domini organizzati in struttura globulare (A-C). Ogni dominio presenta una struttura di tipo β a barile strettamente correlata a quella delle altre proteine a rame blu, come l'azzurrina, la plastocianina e l'ascorbato ossidasi. Il rame T1 si trova nel

dominio A (porzione N-terminale delle proteine), mentre il cluster trinucleare T2T3 si trova a livello d'interfaccia tra i domini A e C (porzione C-terminale). Due ponti disolfuro collegano i domini A con B e A con C, rispettivamente, stabilizzando la struttura. Il rame T1 occupa una cavità abbastanza spaziosa che spiega il basso grado di specificità di substrato delle laccasi. Viceversa, uno o due stretti canali forniscono l'accesso all'ossigeno e il rilascio di acqua dal cluster T2T3.

L'analisi dettagliata del sito di legame del substrato indica che un'istidina e un residuo di aspartico, altamente conservato tra le laccasi fungine, sono presenti, vicini uno all'altro, nella parte interna della cavità; questi due residui sembrano svolgere un ruolo nella sottrazione di un elettrone e nella formazione di un legame idrogeno con il substrato ridotto, mentre un certo numero di residui idrofobi contribuisce al posizionamento del substrato (Bertrand et al., 2002). La natura polare dell'aspartato nella cavità del substrato e l'osservazione che il pH ottimale per la riduzione dei substrati fenolici è nell'intervallo della K_a dell'aspartato, ha portato all'ipotesi che questo residuo possa svolgere un ruolo chiave nel determinare il pH ottimale per l'attività delle laccasi. La presenza di questo residuo carbossilato favorirebbe la deprotonazione del substrato ridotto; è stato osservato che la sostituzione di questo aspartato con un residuo non carico, quali l'asparagina o l'alanina, rende impossibile questo evento diminuendo l'efficienza della laccasi e spostando i valori massimi di attività a pH leggermente superiori (Madzak et al, 2006).

2.1.3 Ruolo fisiologico in natura

Il ruolo fisiologico della laccasi non è stato ancora completamente chiarito anche perché esso sembra variare in relazione al tipo di organismo da cui deriva l'enzima. Per molti anni si è ritenuto che la laccasi prodotta da numerose specie fungine avesse un ruolo diretto nell'ossidazione della lignina. Infatti molti basidiomiceti, soprattutto i funghi "white-rot", sono in grado di mineralizzare la lignina completamente, o comunque in misura molto elevata rispetto ad attinomiceti e batteri. La degradazione della lignina è strettamente correlata alla capacità di questi microrganismi di produrre laccasi esocellulari in associazione con altre enzimi ossidativi quali lignina perossidasi (LiP) e manganese perossidasi (MnP).

E' stato dimostrato che l'azione della laccasi può portare alla rottura di alcuni legami presenti nella lignina, tramite reazioni di ossidazione, di demetilazione e dell'eliminazione della catena laterale della lignina, passaggio iniziale per la biodegradazione. Tuttavia il ruolo della laccasi nel processo di degradazione della lignina in vivo rimane controverso; infatti vi sono organismi ligninolitici che producono tutti e tre gli enzimi (laccasi, LiP e MnP) altri che

ne producono uno solo o due, e non è ancora chiaro quali di queste proteine siano realmente indispensabili per i processi degradativi.

La maggior parte, ma non tutte le laccasi fungine sono extracellulari, alcune specie possono produrre isoenzimi sia extracellulari che intracellulari. Una di queste laccasi prodotta da *Pleutotus ostreatus* mostra attività sia all'interno della cellula che nella parete cellulare (Palmieri et al., 2000). In alcuni funghi la laccasi ha una funzione ben caratterizzata che non è correlata con la ligninolisi, infatti questa proteina sembra essere coinvolta nella morfogenesi. Nel fungo edule *Lentinula edodes* è stata trovata una forte attività laccasica nella fase fruttifera indicando che le laccasi possono catalizzare la formazione di pigmenti extracellulari tramite polimerizzazione ossidativa e quindi possono svolgere un ruolo importante nella morfogenesi del fungo (Zhao e Kwan, 1999). In *Aspergillus nidulans* sono state caratterizzate due laccasi presenti in tessuti differenti: una di queste, prodotto del gene *ya*, è coinvolta nella formazione del colore verde del conidio, e l'altra, localizzata nelle cellule di Hülle e nei primordi clestoteciali, è anch'essa coinvolta nella sintesi dei pigmenti (Clutterbuck, 1972). In alcuni funghi, la formazione del corpo fruttifero potrebbe coinvolgere la produzione di pigmenti extracellulari catalizzata da una fenolossidasi accoppiata alla polimerizzazione ossidativa dei componenti della parete cellulare. A conferma di quanto detto, è stato verificato che in alcuni funghi, come in *Schizophyllum commune*, la sintesi della laccasi è regolata in relazione allo sviluppo del corpo fruttifero (De Vries et al., 1986). *Aspergillus fumigatus*, un fungo filamentoso che produce conidi blu-verdi è un agente patogeno opportunistico importante che affligge soprattutto pazienti immunocompromessi, la pigmentazione dei conidi dell'*A. fumigatus* influenza significativamente la relativa virulenza in un modello murino. Nello studio di Tsai et al. del 1999, sono stati analizzati sei geni, formanti un cluster di 19 kb e sono stati identificati come responsabili della biosintesi dei pigmenti dei conidi in *A. fumigatus*.

In altri funghi, come *Botrytis cinerea*, la produzione di laccasi sembra essere associata ai processi di patogenesi di molte piante coltivate (vite, carota, zucca, etc.). Nelle piante *Cucumis prophetarium* ed *Ecballium elaterium* è stata dimostrata la produzione di cucurbitacine, una famiglia di composti ciclici triterpenoidi che le proteggono dall'attacco del fungo probabilmente inibendo la sintesi della laccasi stessa. (Bar-Nun et al 1990).

Infine la laccasi è un fattore importante nel determinare la virulenza del fungo *Cryptococcus neoformans*, un microrganismo patogeno per l'uomo, soprattutto per individui immunodeficienti, come i malati di AIDS o pazienti che hanno subito trapianti. Anche in questo caso la laccasi è coinvolta nella formazione di intermedi reattivi che proteggono il fungo e gli consentono di danneggiare le cellule di mammifero.

Nei tessuti vegetali poi, il ruolo della laccasi sembra essere opposto a quello descritto per i funghi saprofiti del legno. Infatti, è stato riportato che questo enzima può partecipare ai processi di lignificazione. Otto differenti laccasi sono state isolate da *Pinus taeda* (Sato et al., 2001): tutte sono espresse in modo predominante nella parete cellulare dello xilema in differenziazione suggerendo che questi enzimi giocano un ruolo fondamentale nella formazione dello xilema e sono prodotti in coincidenza con la formazione della lignina. Inoltre una di queste, la Lac7, è espressa in tutti gli organi e i tessuti investigati eccetto che nel floema, suggerendo che questi isoenzimi abbiano diverse funzioni oltre alla sintesi della lignina. Tutti i membri della famiglia delle Anacardiacee di cui fa parte l'albero della lacca sembrano contenere laccasi nei condotti della resina e nella resina secreta (Huttermann et al., 2001) suggerendo un ruolo nella difesa contro predatori erbivori e attacchi da parte di batteri e funghi. La secrezione di un enzima che può causare reazioni ossidative alla superficie della ferita suggerisce un ruolo nella guarigione della ferita. E' stato inoltre osservato che anche in altre piante, in seguito ad attacco microbico, la laccasi viene secreta insieme ad una miscela di fenoli che, a contatto con l'aria, vengono ossidati con conseguente polimerizzazione e formazione di un complesso lignino-simile con funzione protettiva. Allo stesso tempo durante l'attacco da parte dei funghi, la biodegradazione della lignina porta alla formazione di intermedi reattivi dai quali il micelio si protegge polimerizzandoli.

Altri lavori hanno descritto la presenza di laccasi in foglie di *Aesculus parviflora* (Wosilait et al., 1954), nelle radici del te (Gregory e Bendall, 1966) e anche nello xilema di *Populus euramericana* (Ranocha et al., 1999), tuttavia la produzione di questi enzimi da parte delle piante e la loro caratterizzazione è ancora poco dettagliata.

Una laccasi è stata rilevata nella cuticola di parecchie specie d'insetto (Thomas et al., 1989). La sclerotizzazione della cuticola è un evento critico comune a tutti gli insetti, che avviene quando le proteine nella cuticola sono cross-linked da chinoni altamente reattivi formati dall'ossidazione di catecoli da parte di specifiche fenolossidasi. Nei ditteri *Drosophila virilis* (Yamazaki, 1969) e *Lucilia cuprina* (Barrett, 1987), così come nel lepidottero della seta *Bombyx mori* (Yamazaki, 1972), questa attività è stata correlata con i periodi di muta, suggerendo un collegamento con la formazione della nuova cuticola. Gli studi di Thomas et al. (1989) indicano che la laccasi di *Manduca sexta* è importante per l'ossidazione cuticolare degli *o*-difenoli a *o*-chinoni e *p*-chinoni, agenti importanti per la sclerotizzazione dell'esoscheletro delle pupe di *M. sexta*. Per facilitare gli studi sulla struttura, funzione e regolazione delle laccasi degli insetti, Dittmer et al. (2004) hanno clonato due cDNAs delle laccasi dal verme del tabacco *M. sexta* (MsLac1 e 2) e uno della zanzara della malaria *Anopheles gambiae* (AgLac1). La RT-PCR ha rivelato che la trascrizione di MsLac1

era più abbondante nell'intestino medio, nei tubuli di Malpighi e nell'epidermide indicando il suo coinvolgimento nei processi fisiologici tranne che nella sclerotizzazione della cuticola, mentre la trascrizione di MsLac2 era più abbondante nell'epidermide confermando il ruolo presunto della laccasi nella sclerotizzazione della cuticola. E' anche possibile che negli astaci questo enzima possa essere importante nella formazione di capsule intorno ai parassiti troppo grandi da fagocitare (Cardenas e Dankert, 2000).

I ruoli attribuiti alle laccasi nei batteri comprendono la sporulazione e la pigmentazione in *Bacillus sphaericus* (Claus e Filip, 1997) e *Marinomonas mediterranea* (Sanchez-Amat e Solano, 1997), e la pigmentazione delle spore in *Bacillus subtilis* (Hullo et al., 2001), conferendogli resistenza a fattori di stress come radiazioni UV e perossido di idrogeno (Martins et al., 2002).

2.2 PRODUZIONE DI LACCASI IN FUNGHI BASIDIOMICETI

La maggior parte dei funghi basidiomiceti, soprattutto quelli di tipo “white-rot”, secernono livelli significativi di laccasi nel mezzo di coltura. La produzione di questo enzima è influenzata in modo significativo dalle condizioni di crescita come composizione del terreno, rapporto tra carbonio e azoto, pH, temperatura, aereazione, etc. In molti casi sono presenti diverse forme isoenzimatiche che differiscono solo leggermente nella sequenza amminoacidica. In passato si pensava che la presenza di diversi isoenzimi fosse da attribuire a modificazioni post-traduzionali dello stesso prodotto genico, ma l'analisi delle sequenze ha dimostrato che una parte di questa diversità biochimica è dovuta alla presenza di famiglie geniche. Queste famiglie sono composte da geni regolati in modo differenziale, alcuni espressi in modo costitutivo ed altri in modo inducibile. Le condizioni ottimali per la produzione di laccasi, e quindi i meccanismi di regolazione coinvolti, variano in modo significativo da una specie ad un'altra.

La composizione del terreno di coltura, in particolare la fonte di azoto e di carbonio, influenza in modo significativo l'espressione dei geni che codificano per le laccasi. Eggert et al. (1996) hanno dimostrato che i livelli di attività laccasica secreta nel mezzo in colture liquide di *Pycnoporus cinnabarinus* sono dipendenti dalla concentrazione di azoto; Collins e Dobson (1997) hanno osservato che la produzione di laccasi in *T. versicolor* è regolata a livello trascrizionale dalla concentrazione di azoto e di rame: in presenza di concentrazioni crescenti di azoto si osserva un incremento nell'espressione dei geni *lcc*.

La produzione di laccasi nelle colture fungine può essere incrementata in modo significativo emendando il terreno con alcuni composti aromatici o con metalli, in particolare il rame. I potenziali induttori comprendono composti fenolici, strettamente correlati alla lignina o da essa derivati, ed in minor parte arilamine di varia origine. Quelli utilizzati più frequentemente comprendono la 2,5-xilidina, fenoli sostituiti (guaiacolo, *p*-metossifenolo, *p*-aminofenolo, resorcinolo, orcinolo), acidi (ferulico, siringico, gallico, caffeico, 3,5-diidrossibenzoico, *p*-idrossibenzoico e tannico), e aniline (*o*- e *p*-anisidina e *p*-toluidina; Gianfreda et al., 1999).

In *P. cinnabarinus*, è stato osservato che la presenza di 2,5-xilidina nel mezzo di coltura aumenta in modo significativo l'espressione della laccasi codificata dal gene *lcc3-1*, mentre la trascrizione di *lcc3-2* risulta essere inibita dalla presenza di questa sostanza (Otterbein et al., 2000). *Marasmius quercophilus* (ceppo 17), invece, presenta due forme isoenzimatiche di laccasi di cui una è prodotta in modo costitutivo e l'altra in modo inducibile, in presenza di acido *p*-idrossibenzoico come induttore (Dedeyan et al., 2000). Nel basidiomicete *Trametes villosa*, l'aggiunta di 2,5-xilidina come induttore al terreno di coltura aumenta il livello di espressione del gene *lcc1* di 17 volte, e contemporaneamente si osserva un incremento dell'attività enzimatica secreta di circa 20 volte (Yaver et al., 1996); inoltre questo induttore determina anche la produzione di tre diverse isoforme di laccasi con peso molecolare tra 60000 e 70000 (Collins et al., 1997).

In alcuni casi anche l'aggiunta al terreno colturale di miscele di differenti composti aromatici si è dimostrata vantaggiosa: infatti D'Souza et al. (2004) hanno osservato che, in colture di *Pleurotus polmonarius*, l'aggiunta contemporanea di acido ferulico e vanillico può avere un effetto di induzione anche 10 volte superiore rispetto alle condizioni colturali in cui questi composti vengono aggiunti nel brodo singolarmente.

In molti funghi, la produzione di laccasi può essere notevolmente migliorata aggiungendo al terreno di coltura ioni metallici. In particolare il rame è un micronutriente essenziale per molti microrganismi ed è richiesto a basse concentrazioni, nell'ordine di 1-10 μ M. Questo metallo è in grado di indurre fortemente, a concentrazione adeguate, la produzione di laccasi in numerosi funghi basidiomiceti *white-rot* (Galhaup et al., 2001).

In *P. ostreatus*, che produce tre laccasi denominate PoxA2, PoxC PoxA1b, il rame è l'induttore più efficiente fra quelli analizzati, soprattutto su PoxA2 e PoxA1b (Palmieri et al., 2000). Inoltre Soden e Dobson (2001) hanno studiato l'effetto delle condizioni di coltura sull'espressione di quattro geni *lcc* in *Pleurotus sajor-caju*; il rame determina l'aumento dei trascritti corrispondenti ai geni *lac1*, 2 e 4, mentre il livello del trascritto di *lac3* non sembra

essere influenzato dalle condizioni colturali analizzate facendo supporre che questo gene venga espresso in modo costitutivo.

Baldrian et al. (2001), invece, hanno studiato l'effetto dell'aggiunta al terreno colturale di *P. ostreatus* di metalli pesanti che causano inquinamento ambientale, come Cu, Cd, Hg, Ag, Zn e Pb, in un intervallo di concentrazioni compreso tra 0,1 e 5 mM. I risultati ottenuti mostrano che l'attività enzimatica prodotta si dimezza in presenza di mercurio anche a basse concentrazioni. Invece, cadmio e rame determinano un incremento nell'attività laccasica secreta nel brodo, ed inoltre il rame ad alte concentrazioni aumenta la stabilità della laccasi secreta aumentando in modo significativo la quantità di enzima in forma attiva.

La produzione di laccasi può essere spesso migliorata combinando contemporaneamente gli effetti di stimolo dovuti alla composizione del terreno e all'aggiunta di composti aromatici e rame come induttori. Ad esempio è stato osservato un incremento di 30 volte dell'attività laccasica prodotta da *Trametes C30* quando il fungo viene cresciuto per otto giorni in un terreno costituito da estratto di malto e tween, che favorisce la secrezione di enzimi, addizionato con rame e acido *p*-idrossibenzoico. L'aumento di attività laccasica è correlata alla produzione di isoforme minoritarie, con elevata attività specifica, indotte nelle condizioni di coltura descritte (Klonowska et al., 2001).

Una possibilità interessante è individuare, per la crescita dei funghi, substrati naturali facilmente disponibili e poco costosi, derivati ad esempio da scarti agroindustriali, che possano al contempo stimolare la produzione di laccasi. Sfruttando l'osservazione che i funghi in grado di crescere e degradare i composti ligninocellulosici spesso producono elevati livelli di laccasi, i materiali di scarto dell'industria alimentare, come semi e fibre di orzo, sono stati utilizzati come substrato di crescita per *T. versicolor* (Lorenzo et al., 2002). In presenza di questi composti grezzi si producono elevati livelli di laccasi; in particolare l'utilizzo di fibre di orzo determina un aumento di 10 volte nella quantità di enzima secreto. Studi successivi (Moldes et al., 2004) hanno dimostrato che nelle condizioni descritte l'aumento dell'attività laccasica da parte di *T. versicolor* è dovuto alla presenza di due isoenzimi, LacI e LacII, la cui produzione è fortemente influenzata dalla tipologia di materiale ligninocellulosico che viene utilizzato.

Infine Kaharman et al. (2003) hanno studiato la produzione di laccasi da parte dei funghi *Coriolous versicolor* e *Funalia trogii* in differenti terreni sintetici e naturali, come le acque di vegetazione che derivano dalla distillazione degli zuccheri fermentati, in presenza e in assenza di gambi di cotone. I risultati ottenuti hanno confermato che queste acque di vegetazione sono un substrato adatto per la crescita di entrambi i funghi e per la produzione di laccasi. L'aggiunta di gambi di cotone aumenta i livelli di enzima nel brodo di coltura fino a 100

volte. Questi risultati suggeriscono la possibilità di utilizzare substrati grezzi ed economici per la produzione di laccasi a livello industriale.

2.2.1 Laccasi del fungo *Trametes trogii*

Trametes trogii 201 (DSM11919) è un basidiomicete *white-rot* studiato da anni nel nostro laboratorio. Questo fungo è in grado di degradare in modo efficiente i componenti del materiale ligninocellulosico e, al contempo, è un buon produttore di laccasi (Alfani et al., 1990).

Il brodo colturale prodotto dai funghi contiene generalmente una laccasi principale ed un certo numero di isoforme, alcune di queste strettamente correlate, altre che differiscono per le proprietà strutturali e catalitiche. La produzione di isoenzimi differenti è dovuta alla presenza di geni multipli; l'espressione di alcuni di questi geni è up-regolata dalla presenza nel terreno di coltura di induttori specifici quali rame, acido ferulico o 2,5-xilidina (Collins e Dobson, 1997; Gianfreda et al., 1999; Palmieri et al., 2000).

Quando *T. trogii* viene cresciuto in coltura sommersa su terreno sintetico addizionato con estratto di lievito, produce una laccasi principale, denominata Lcc1, che è stata purificata e caratterizzata (Garzillo et al., 1998). Lcc1 presenta peso molecolare di circa 60000, potenziale redox del rame di tipo 1 elevato (790 mV), punto isoelettrico acido ed un'intensa banda di assorbimento nel visibile a 600 nm tipica delle ossidasi blu contenenti rame. L'enzima purificato catalizza l'ossidazione di numerosi composti fenolici e non, anche recalcitranti, come ammine aromatiche e clorofenoli, presenta un pH ottimale acido nei confronti dei substrati fenolici, ed una termostabilità superiore a quella di laccasi prodotte da altri *Trametes*. L'analisi della specificità di substrato indica che la laccasi Lcc1 di *T. trogii* catalizza in modo preferenziale l'ossidazione di fenoli sostituiti che presentano in posizione *orto* e/o *para* almeno un altro sostituente *orto/para* orientante, capace di aumentare la densità elettronica sul gruppo ossidato (Garzillo et al., 1998).

Lo studio dei geni che codificano per le laccasi di *T. trogii* e del loro meccanismo di regolazione ha permesso di individuare almeno quattro geni *lcc* sul DNA genomico, il gene *lcc1* è stato isolato, mediante una strategia basata sulla PCR, e caratterizzato (Colao et al., 2003; 2006).

Per mezzo del protocollo RACE, un secondo gene di laccasi, *lcc2*, è stato clonato, sequenziato e caratterizzato. Per la proteina tradotta dalla sequenza del DNA è stato calcolato un peso molecolare del 56.800. La sequenza proteica dedotta dal cDNA presenta tutti i ligandi del rame tipici delle ossidasi blu (una cisteina e dieci istidine) e sei potenziali siti di

N-glicosilazione. Il gene *lcc2* presenta un'identità del 69.2% e una similarità dell'87% con l'isoforma principale Lcc1 (Colao et al., 2006). Il gene *lcc2* è stato espresso in *Pichia pastoris* e caratterizzato in questo lavoro di tesi. Lcc2 conserva tutti i residui amminoacidici essenziali per l'attività della laccasi, come l'aspartato situato nella parte interna della cavità del substrato. Tuttavia, Lcc2 presenta un pH ottimale per i substrati fenolici significativamente più alto della Lcc1. Le proprietà catalitiche di Lcc2 sono state discusse in relazione alle informazioni strutturali ottenute tramite modeling molecolare.

2.3 APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE DELLE LACCASI

Per il tipo di reazione catalizzata, le laccasi presentano un notevole interesse applicativo. Dal momento che i substrati naturali delle laccasi sembrano essere lignina e composti da essa derivati, vi sono diverse potenziali applicazioni industriali basate su questa proprietà. Una delle applicazioni più studiate è certamente nell'**industria della carta** per la produzione di paste di cellulosa dal legno o dalla paglia o per lo sbiancamento delle paste di cellulosa, per sostituire i processi convenzionali che fanno uso di alte temperature, soda caustica, solfati o solfiti (a seconda del tipo di carta o cartone da produrre) (Mayer e Staples, 2002). Il trattamento con la laccasi consente non solo di ottenere un efficiente sbiancamento delle paste per la produzione di carta ma migliora anche le caratteristiche delle fibre ottenute. Inoltre potrebbe essere utilizzata nel trattamento delle acque reflue dell'industria della carta per ridurre gli elementi inquinanti e per generare risorse rinnovabili (Youn et al., 1995; Archibald et al., 1997). Infatti, può essere utilizzata per la rimozione del colore dai materiali utilizzati per la produzione di carta riciclata che spesso contengono inchiostro o in forma immobilizzata, per rimuovere il cloro dai composti clorofenolici che sono presenti nei reflui e sono inquinanti ambientali molto tossici (Leontievsky et al., 2001).

Un'interessante possibilità è quella di usare la laccasi in combinazione con i mediatori che ne ampliano le capacità catalitiche: un esempio è la formulazione brevettata col nome di LMS, Laccase-Mediator-System (Lignozym®-process), costituita da una combinazione di laccasi di *T. versicolor* e composti con sostituenti N-OH, come l'idrossibenzotriazolo, che nella loro forma ossidata sono degli agenti sbiancanti molto efficaci (Call e Mücke, 1997).

Un altro settore nel quale potrebbe essere utilizzata la laccasi è l'**industria dei cosmetici**: la colorazione e decolorazione dei capelli prevede l'uso di agenti chimici aggressivi che li danneggiano e potrebbero essere sostituiti da questo enzima. Anche i pigmenti usati nelle

applicazioni cosmetiche, come la melanina, possono essere ottenuti sfruttando le reazioni ossidative catalizzate dalle laccasi.

Nell'ambito della sintesi organica un'altra importante applicazione della laccasi riguarda l'ossidazione degli alcheni: in particolare quella di *Trametes hirsuta* è stata utilizzata a questo scopo. Nel processo a due step l'enzima catalizza prima l'ossidazione di un substrato primario, un mediatore aggiunto alla reazione, e poi il mediatore ossidato ossida l'alchene al corrispondente aldeide o chetone: i risultati migliori si ottengono usando come mediatore l'idrossibenzotriazolo (Niku et al., 2000). La laccasi può essere impiegata per incrementare la produzione di etanolo da materiale grezzo: la laccasi isolata dal fungo *T. versicolor*, espressa nel batterio *Saccharomyces cerevisiae*, incrementa la resistenza agli inibitori fenolici presenti nella cellulosa idrossilata (Larsson et al., 2001).

Molte sono anche le applicazioni nell'**industria alimentare**; ad esempio le laccasi, immobilizzate su supporti appropriati come l'agarosio, possono essere utilizzate per rimuovere dal vino le sostanze fenoliche indesiderate che possono alterarne la qualità. (Servili et al., 2000; Brenna e Bianchi, 1994). Gli stessi trattamenti possono essere effettuati nella produzione di succhi di frutta (Stutz, 1993) e birra (Mathiasen, 1995) allo scopo di chiarificare queste bevande. Inoltre, le laccasi sono impiegate per stimare il contenuto di fenoli nei succhi naturali o di catecolo nel tè. (Stutz, 1993).

Nell'**industria del legno** sono stati recentemente studiati sistemi chitosano-fenolici accoppiati alle capacità fenolo-ossidative per produrre adesivi per il legno (Svetlana e Kainchang, 2003). Un'altra possibile applicazione che sfrutta sempre le capacità delle laccasi di agire su componenti della lignina è la produzione di MDF (Medium Density Fiberboard), un materiale attualmente utilizzato per la costruzione di mobili e arredi per interni. La manifattura di questo materiale si basa sulla formazione di una resina costituita da componenti derivati dalla lignina nella quale sono inclusi frammenti di legno che formeranno i pannelli. Il processo di cross-linking che porta alla formazione della matrice prevede l'utilizzo di composti tossici come la formaldeide che, non solo vengono in parte rilasciati nei reflui durante il processo di lavorazione, ma possono essere anche lentamente liberati nel luogo in cui i prodotti finali verranno utilizzati creando un danno ambientale. La laccasi può essere utilizzata con vantaggio al posto della formaldeide nel processo di cross-linking per produrre pannelli di qualità paragonabile.

Le laccasi sono state impiegate anche in **campo farmaceutico** per sintetizzare nuove cefalosporine e per incrementare la sintesi di nuovi potenziali antibiotici (Agematu et al., 1993; Janse et al., 1998).

I metodi di **bioremediation** basati sull'uso di enzimi mostrano, rispetto alle metodologie convenzionali, diversi vantaggi: hanno un impatto ridotto sugli ecosistemi, una richiesta inferiore di energia, un facile controllo del processo, la possibilità di operare in un ampio intervallo di pH, temperatura e forza ionica. Inoltre, in alcuni casi, gli enzimi da soli sono in grado di trasformare composti tossici in sostanze meno pericolose o addirittura innocue senza la necessità di una degradazione completa. Attualmente non esistono ancora applicazioni commerciali al riguardo. Uno dei maggiori ostacoli è rappresentato dal fatto che, nella maggior parte dei casi, le sostanze xenobiotiche hanno una natura idrofobica e la loro trasformazione enzimatica avviene con maggiore facilità in presenza di solventi organici; questi ultimi tuttavia potrebbero avere effetti inibenti sugli enzimi coinvolti nel processo. Tuttavia, in alcuni casi, la stabilità degli enzimi può essere aumentata ricorrendo a tecniche di immobilizzazione (Abadulla et al., 2000): la laccasi prodotta dal fungo *Coriolus versicolor* si è dimostrata capace di ossidare i 2,4,6-triclorofenoli a 3,5-diclorocatecolo e 2,6-dicloro-1,4-benzochinone ad una temperatura di 50 °C e pH 7.0 (Leontievsky et al., 2000). Recenti applicazioni in bioremediation includono un sistema *ex planta* di fitoriciclaggio di triclorofenolo e fenolo con l'impiego di una laccasi secreta.

Le laccasi possono giocare un ruolo importante nella degradazione degli idrocarburi policiclici aromatici (PAH) che sono inquinanti ambientali recalcitranti e ubiquitari che si formano dalla combustione incompleta di materiali organici, soprattutto nelle operazioni di raffinazione di carburanti fossili e nel loro impiego (Blumer, 1996). La maggior parte dei PAH a basso peso molecolare (fino a 3 anelli aromatici) è molto tossica per gli organismi acquatici (Moore et al., 1989). I composti ad alto peso molecolare (4 anelli aromatici o più) sono altamente mutageni, teratogeni, carcinogeni per l'uomo e gli animali (Pahlman e Pelkonen, 1997). Come emerso da vari studi, le laccasi sono in grado di ossidare questi composti in presenza di mediatori, quali ABTS e HBT (Majcherzyk e Johannes, 2001). Un'ulteriore applicazione della laccasi nel settore ambientale riguarda il trattamento delle acque di vegetazione degli oleifici, la cui produzione è particolarmente elevata nell'area del Mediterraneo. Durante il processo di estrazione dell'olio si formano composti fenolici, in particolare polimeri con struttura simile alla lignina, altamente tossici e recalcitranti. A questo proposito è stata valutata la possibilità di usare la laccasi nella detossificazione delle acque di vegetazione; si è visto, infatti, che alcuni ceppi di *P. ostreatus* possono utilizzare tali composti come substrati di crescita, riuscendo a rimuovere fino al 76% degli elementi fenolici presenti (Tsioulpas et al., 2002). Anche in alcuni ceppi del fungo *Chalara paradoxa*, direttamente isolati dalle acque reflue della lavorazione dell'olio, è stata rilevata la produzione di laccasi (Robles et al., 2000). Si è supposto che in questi funghi la laccasi possa giocare un ruolo

fondamentale nella degradazione delle sostanze di natura fenolica, permettendo al microrganismo di sopravvivere e svilupparsi in tale ambiente.

La laccasi può essere utilizzata per monitorare i danni ambientali dovuti all'inquinamento industriale. Alcuni composti presenti nei prodotti di scarto dell'industria del carbone, del gas e dell'olio possono funzionare da substrati per la laccasi, che così può diventare un buon candidato per la fabbricazione di **biosensori**. La laccasi, infatti, può essere facilmente accoppiata con un elettrodo ad ossigeno che permette di effettuare misure amperometriche con buona sensibilità, consentendo, in tal modo, di quantificare il grado di inquinamento dovuto alla presenza nell'ambiente di composti tossici (Ghindilis et al., 1992). Nella costruzione di biosensori, la laccasi è stata utilizzata anche per lo sviluppo di un nuovo metodo enzimatico che permette di distinguere la morfina dalla codeina; il sensore enzimatico è stato costruito immobilizzando la laccasi e la glucosio-deidrogenasi su un elettrodo ad ossigeno di Clark: la morfina è ossidata dalla laccasi con consumo d'ossigeno e rigenerata dalla glucosio deidrogenasi. La laccasi non può ossidare la codeina, così il sensore è selettivo per la morfina; questo metodo rapido e tecnicamente semplice permette di discriminare la morfina dalla codeina in meno di un minuto (Bauer et al., 1999).

Per quanto riguarda **l'industria tessile e dei coloranti** ci sono dei processi già affermati che usano laccasi per lo sbiancamento di fibre tessili: nel 1996 la Novozyme ha lanciato un'applicazione per ottenere l'effetto *stone washing* sul denim, denominata DeniLite® (Duran, 2000). Esistono oltre 100.000 coloranti commercialmente usati, (Zollilnger, 2000) e il settore del tessile detiene i due terzi dell'intero mercato dei coloranti. La laccasi può essere adoperata con vantaggio sia come agente sbiancante nella fabbricazione delle stoffe che come agente per la rifinitura del prodotto (può determinare una maggiore luminosità e solidità dei colori dei tessuti). Infine, anche in ambito domestico, potrebbe essere utilizzata per eliminare il colore che si libera durante il lavaggio dagli indumenti e che si può depositare su altri capi.

Dal momento che la laccasi è in grado di ossidare molti composti colorati può essere adoperata efficacemente per il **trattamento di reflui** che li contengono ed è proprio questo il campo verso cui sono rivolte molte delle nostre prove sperimentali. Infatti i coloranti sintetici, largamente utilizzati in numerosi settori industriali, sono prodotti in grandi quantità e il loro rilascio nell'ambiente è causa di inquinamento e costituisce un fattore di rischio per la salute. I coloranti presentano un'ampia diversità strutturale: le classi di composti chimici più frequentemente impiegate sono di tipo azoico, ma sono adoperati anche composti antrachinonici, indigoidi e triarilmetani. Numerosi metodi fisici, come l'adsorbimento su matrici, sono stati sviluppati per il trattamento dei reflui, ma non sono selettivi e spesso sono poco efficienti. Invece, l'utilizzo di microrganismi o comunque di enzimi ossidativi è una

tecnologia alternativa che presenta numerosi vantaggi quali l'abbattimento dei costi di processo e la completa mineralizzazione dei composti a molecole non tossiche.

2.4 I COLORANTI

2.4.1 Storia dei coloranti

Fin dai tempi degli uomini delle caverne, che affrescarono le grotte con varie rappresentazioni di caccia e funerarie, ad arrivare agli Egiziani, ai Greci e ai Romani, il colore è stato un costante compagno della civiltà. L'uso dei coloranti è un'arte molto antica, e sicuramente i coloranti vegetali sono noti prima della tradizione scritta. Fino a due secoli fa la maggior parte dei coloranti erano di origine vegetale o animale e l'arte della fabbricazione era un segreto complicato tramandato da una generazione all'altra. I coloranti venivano estratti dalle piante essenzialmente macerando radici, foglie o bacche in acqua. Gli estratti spesso venivano bolliti e poi filtrati; in alcuni casi era necessario acidificare o basificare per poter liberare il colorante dai tessuti vegetali. Anche l'applicazione dei coloranti sul tessuto era un procedimento complicato, e si applicavano dei mordenti per fissare il colorante o anche per modificarne il colore. Del gran numero di coloranti naturali, solo un esiguo numero (circa una decina) è ancora in uso grazie alla sua stabilità. Tra questi figurano il robbio, che è uno dei coloranti più antichi. Si dice che Alessandro il Grande abbia usato questo colorante, dal brillante colore rosso, per ingannare i Persiani in una battaglia delicata. L'analisi chimica moderna ha permesso di stabilire la struttura del colorante presente nelle radici della robbia: si tratta di alizarina molto simile a un altro antico colorante, l'henné o lawsone (proveniente dalle foglie della pianta indiana *Lawsonia*), origine di una lunga serie di coloranti rossi sintetici. Un altro colorante vegetale molto antico è l'indaco: estratto dalla pianta *Indigofera tinctoria*, esso è noto in Asia da più di 4000 anni. Oggi l'indaco viene preparato per sintesi e viene utilizzato soprattutto nella produzione dei "blu jeans". Il colorante Porpora di Tiro, il cui nome sembra derivare dal termine greco *porphyra*, è tratto da uno speciale prodotto di secrezione di molluschi della famiglia *purpuridae*, appartenente al genere detto *murex*; è un dibromoderivato dell'indaco ed era il miglior colorante dell'antichità. La porpora era un colore riservato ai re in quanto era estratta in piccole quantità ed il suo costo era elevatissimo.

Prima del 1856 tutti i coloranti provenivano da fonti naturali. In quell'anno tuttavia una casuale scoperta del chimico inglese W.H. Perkin dette inizio allo sviluppo dell'enorme industria dei coloranti sintetici. Perkin, che allora aveva solo 18 anni, cercava di sintetizzare la

chinina e siccome a quei tempi il dato strutturale principale era la formula molecolare, pensò, basandosi su di essa, che fosse possibile arrivare alla chinina per ossidazione della alliltoluidina. Egli preparò l'alliltoluidina e la ossidò con bicromato sodico, senza peraltro ottenere il prodotto voluto, dato che l'alliltoluidina non ha alcuna relazione strutturale con la chinina. Tuttavia ottenne dalla reazione un precipitato rosso bruno che lo interessò, tanto che decise di provare la medesima reazione su una base più semplice, l'anilina. Trattando il solfato di anilina con bicromato di potassio egli ottenne un precipitato nero, che poteva venir estratto con etanolo per dare una soluzione di magnifico color porpora, che si dimostrò poi un buon colorante per tessuti. Avendo ricevuti molti elogi dai coloristi, Perkin diede le dimissioni dal Royal College e fondò l'industria inglese dei coloranti dal catrame di carbon fossile. Egli ebbe un grande successo come industriale e poté ritirarsi a soli 36 anni per dedicarsi esclusivamente alla ricerca scientifica. Il colorante da lui sintetizzato nel 1856 ebbe il nome di mauveina, ma la sua struttura venne stabilita soltanto molto più tardi (Meth-Cohn, 1995). Esaminandola, è chiaro che Perkin usò anilina impura, contenente anche le tre toluidine isomere. La mauveina fu il primo colorante sintetico, ma ben presto vennero scoperti in Francia (1859) i coloranti del trifenilmetano, tra cui la pararosanilina, il verde malachite e il crystal violetto.

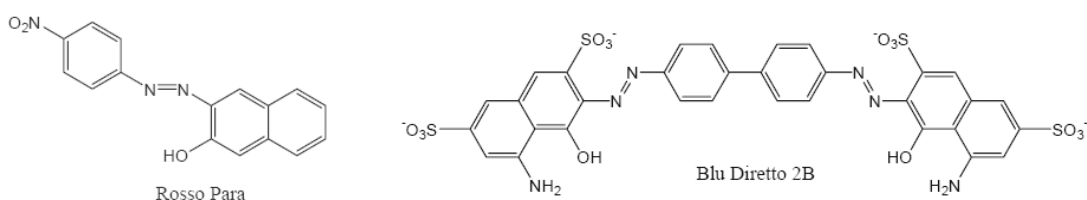
Ad essi seguirono l'alizarina sintetica (Graebe e Liebermann, 1868), l'indaco sintetico (Bayer, 1879) e i coloranti azoici (Griess, 1862). Tutti questi coloranti vengono sintetizzati dall'anilina e dalle toluidine (orto, meta e para) e da composti aromatici come benzene, naftalene ed antracene, tutte sostanze contenute nel catrame di carbon fossile, un materiale grezzo ottenuto per distillazione del carbone. La scoperta di Perkin trasformò questo materiale, che prima era considerato una seccatura di cattivo odore, nella base di un'industria multimiliardaria. Oggi gli stessi prodotti di partenza possono venir ricavati dal petrolio come sottoprodotti della raffinazione della benzina, cosicché molti coloranti sintetici sono ancora in uso, anche se non provengono più dal catrame del carbon fossile.

2.4.2 Classificazione

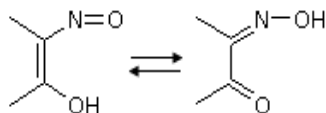
In una molecola di colorante si distinguono due parti, il cromoforo e l'auxocromo. Il cromoforo è la parte responsabile del colore e quindi è in grado di assorbire una frazione della radiazione visibile (400-700 nm). L'auxocromo è la parte responsabile del legame con il supporto (legherà la molecola al substrato da tingere) e in genere anche della solubilità del colorante.

Esistono fondamentalmente due classificazioni dei coloranti: una tecnica, nella quale i coloranti sono raggruppati a seconda della modalità di applicazione (acidi, basici, reattivi, diretti), e una chimica che li ordina in riferimento alla loro struttura chimica e, pertanto, risulta più interessante da un punto di vista scientifico. In base a quest'ultima classificazione possiamo distinguere:

- **coloranti azoici**, caratterizzati dalla presenza di uno o più cromofori “azo” ($-N=N-$). L'importanza dei gruppi azo risiede nel fatto che modificando la funzionalità alle due estremità si può modulare colore e solubilità. In base al numero di gruppi “azo” si distinguono coloranti mono-, di- e triazoici. Gli azoici rappresentano circa il 70% dei coloranti utilizzati nell'industria. Si ottengono sempre tramite opportune reazioni di diazocopulazione. L'azobenzene è praticamente incolore, ma un aumento della complessità strutturale, con l'inserimento di strutture aromatiche polinucleari, e soprattutto con la presenza di gruppi polari ionici come il gruppo amminico e il gruppo fenolico determina la comparsa di colori intensi anche fino al nero. Nel Rosso Para, il nitrogruppo dà un importante contributo al sistema coniugato. Nel Blu Diretto, il sistema coniugato è straordinariamente esteso.

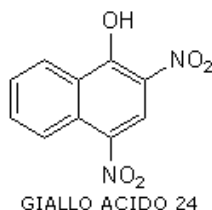


- **nitroso coloranti**, presentano nella loro struttura un gruppo nitroso ($-NO$), associato all'OH fenolico in posizione orto. Una simile struttura è in equilibrio tautomerico con una seconda forma, detta chinonossina.

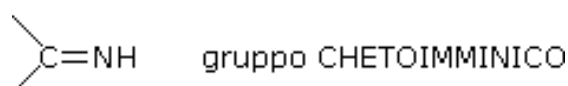


Composti con un gruppo di questo tipo, soprattutto nella forma chinonossinica, sono in grado di formare dei complessi coi metalli, si tratta quindi di tipici coloranti a mordente. I coloranti di questa serie vengono definiti poligenici, il loro colore è funzione del metallo utilizzato per formare il complesso; attualmente in commercio sono ancora presenti esclusivamente prodotti mordenzati con ferro, col quale formano lacche verdi, mentre con il cromo formano lacche brune.

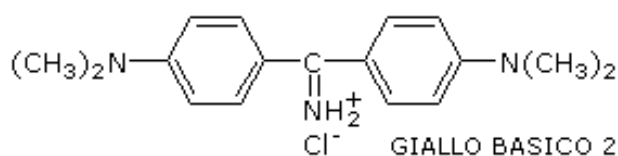
- **nitro coloranti**, contengono un gruppo “nitro” ($-\text{NO}_2$) in posizione orto rispetto all’ossidrile fenolico (idrossinitrocoloranti) o al gruppo imminico $=\text{NH}$ (imminonitrocoloranti). Tra i primi uno dei più semplici è il giallo acido 24 detto anche giallo Martins.



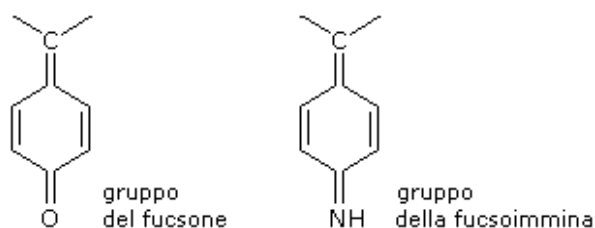
- **coloranti del diarilmetano**, considerati derivati del difenilmetano, nel quale i due atomi di idrogeno vengono sostituiti con un gruppo chetoimminico.



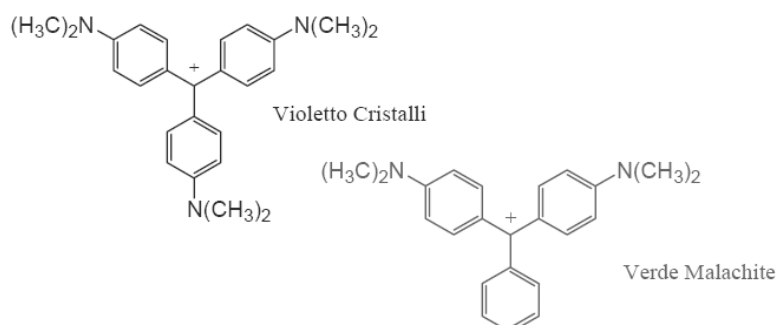
Agli anelli aromatici vanno invece aggiunti dei gruppi attivanti (generalmente gruppi amminici semplici o sostituiti).



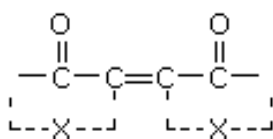
- **coloranti del trifenilmetano** Costituiscono una classe molto numerosa di sostanze coloranti caratterizzate dalla presenza nella loro molecola di tre gruppi aromatici uniti allo stesso atomo di carbonio, i loro cromofori sono o il gruppo del fucsone o il gruppo della fucsonimmina.



Gli altri due anelli aromatici sono generalmente sostituiti in para con gruppi ossidrilici o amminici. Sono molto usati come coloranti per inchiostri. Sono carbocationi stabilizzati dall'estesissima coniugazione.

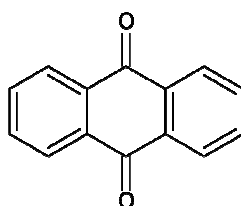


- **coloranti indigoidi**, il cui nome è dovuto all'indaco, colorante naturale caratterizzato dal cromoforo:



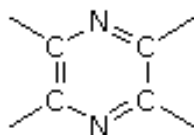
dove X è un gruppo aromatico più o meno complesso.

- **coloranti antrachinonici**, contengono il cromoforo antrachinonico inserito in un sistema più o meno complesso. L'antrachinone e alcuni suoi derivati costituiscono le sostanze di partenza per la preparazione di numerosi coloranti, tanto che oggi costituiscono il secondo gruppo più esteso per importanza commerciale. Presentano una gamma di colori dal blu al giallo.



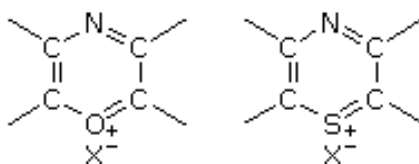
antrachinone

- **coloranti azinici**, che presentano un gruppo azinico come cromoforo.



cromoforo azinico

Nei coloranti ossazinici e tiazinici, un atomo di azoto è stato sostituito con un atomo di ossigeno (ossi-) o di zolfo (tio-) .



cromoforo ossazinico e tiazinico

2.4.3 Utilizzi e svantaggi

Negli ultimi anni c'è stato un aumento dell'interesse verso la protezione ambientale. Molti coloranti chimici sono utilizzati in varie applicazioni industriali come l'industria tessile, alimentare, farmaceutica, cosmetica, del cuoio, etc. Oltre 100000 coloranti sono disponibili in commercio, con una produzione mondiale di circa un milione di tonnellate annue, di cui il 60-70% è rappresentato da azocoloranti. (Carliell et al., 1995; Stolz, 2001; Adedayo et al., 2004).

I coloranti sono principalmente prodotti di sintesi e vengono impiegati per il 60% nell'industria tessile e per il rimanente nell'industria della carta, delle resine, della plastica, del legno, delle vernici e nell'industria degli alimenti.

Nelle industrie tessili, a causa del basso livello di efficienza del processo di fissazione del colore (tra il 60 e il 90%) sulle fibre, grosse quantità di coloranti vengono rilasciate negli scarichi industriali (Pons et al., 2005). Questi scarichi sono caratterizzati da forte colore, alto pH, alte temperature, e alti valori di COD (domanda biologica di O₂) e TOC (richiesta chimica di O₂) (Daneshvar et al., 2005). La presenza di anche piccole quantità di coloranti è altamente visibile, antiestetica e influenza la trasparenza dell'acqua e conseguentemente anche l'attività fotosintetica degli organismi acquatici e la solubilità dei gas in laghi, fiumi e altri corsi d'acqua (Benat et al., 1996; Nassar e Magdy, 1997; Nigam, 2000). I coloranti e i loro prodotti di degradazione sono poi spesso cancerogeni (Levine, 1991). Una ricerca sulla

mutagenicità degli effluenti mostra che le industrie tessili producono la quantità più consistente di composti altamente mutageni se comparate con altri scarichi industriali (Houk, 1992). Studi effettuati su 45 effluenti dell'industria tessile hanno indicato che il 27% dei campioni delle acque di scarico erano mutageni alla prova di Ames (Carhy, 1997). Fin dal 1895 si è osservato un aumento del cancro alla vescica negli operai addetti alla produzione dei coloranti (Rehn, 1895).

Gli azocoloranti costituiscono la classe di coloranti più utilizzata nelle applicazioni commerciali (Zollinger, 1991) in particolare nell'industria tessile. La riluttanza degli azocoloranti può essere attribuita alla presenza di gruppi solfato e legami azo, due caratteristiche considerate generalmente xenobiotiche (Rieger et al., 2002). Gli anelli sostituiti del naftalene e del benzene sono costituenti comuni degli azocoloranti e sono stati identificati come agenti potenzialmente cancerogeni (IARC, 1982). Anche se non tutti gli azocoloranti sono tossici di per sé, la maggior parte dei loro metaboliti lo è; infatti in ambiente acquatico possono essere convertiti in ammine aromatiche potenzialmente cancerogene e/o mutagene (Ganesh, 1992; Abadulla, 2000).

2.4.4 Metodi di rimozione

Tutti i coloranti sintetici impiegati nell'industria tessile sono generalmente costruiti per resistere allo sbiancamento a contatto con sudore, sapone, acqua e agenti chimici, sono quindi composti caratterizzati da elevata stabilità alla luce, alla temperatura, agli agenti ossidanti e agli agenti microbici; per questo una volta finiti negli effluenti sono difficili da degradare (Meyer, 1981; Reife et al., 1993; Seshadri et al. 1994). La legislazione sempre più rigorosa e una crescente consapevolezza dell'impatto ambientale negativo di questi composti ha provocato negli ultimi anni un aumento degli studi sui processi di degradazione dei coloranti e lo sviluppo di diverse tecniche. Questi metodi di degradazione comprendono metodi fisici, chimici e biologici. I metodi fisici e chimici (Tab. 2.1) come adsorbimento, filtrazione, coagulazione, ossidazione, radiazioni ionizzanti, ozonazione, etc., presentano differenti capacità di decolorazione ma risultano generalmente costosi, poco efficienti e sovente generano prodotti secondari che necessitano ancora di altri trattamenti (Bhatt et al., 2000; Chang et al., 2003). Fra questi ad esempio la coagulazione e l'adsorbimento generano grandi quantità di fanghi che presentano ulteriori problemi di smaltimento. La degradazione chimica con agenti ossidanti come il cloro è tra i metodi più efficaci ma produce molti prodotti tossici, quali composti a base di organo-cloro (Kim et al., 2002). Anche la fotoossidazione con UV/H₂O₂ o UV/TiO₂ necessita di prodotti chimici addizionali e causa un inquinamento

secondario (Daneshvar et al., 2003). C'è quindi un enorme interesse nello sviluppare una via più economica ed efficace. Per questo un'interessante alternativa è rappresentata dai processi biologici che sono più convenienti, producono meno fango e sono più rispettosi per l'ambiente (Applin et al., 2000; Hao et al., 2000; McCallum et al., 2000; Arslan-Alaton et al., 2002). Molti microrganismi, compresi funghi, batteri, lieviti e alghe, possono decolorare e perfino mineralizzare completamente molti azocoloranti in determinate condizioni ambientali (Delee et al., 1998; MCMullan et al., 2001; Stolz, 2001; Rai et al., 2005; Van der Zee e Villaverde, 2005). In particolare risulta interessante l'impiego degli enzimi che agendo in bassa concentrazione ed essendo facilmente biodegradabili garantiscono un basso impatto ambientale ed inoltre sono prodotti da organismi viventi (generalmente funghi o batteri) facilmente coltivabili.

Tabella 2.1 – Vantaggi e svantaggi dei metodi chimico-fisici di rimozione dei coloranti dagli effluenti industriali (Robinson et al., 2001).

Physical/chemical methods	Advantages	Disadvantages
Fentons reagent and insoluble dyes	Effective decolourisation of both soluble	Sludge generation
Ozonation	Applied in gaseous state: no alteration of volume	Short half-life (20 min)
Photochemical	No sludge production	Formation of by-products
NaOCl	Initiates and accelerates azo-bond cleavage	Release of aromatic amines
Cucurbituril	Good sorption capacity for various dyes	High cost
Electrochemical destruction	Breakdown compounds are non-hazardous	High cost of electricity
Activated carbon	Good removal of wide variety of dyes	Very expensive
Peat	Good adsorbent due to cellular structure	Specific surface areas for adsorption are lower than activated carbon
Wood chips	Good sorption capacity for acid dyes	Requires long retention time
Silica gel	Effective for basic dye removal	Side reactions prevent commercial application
Membrane filtration	Removes all dye types	Concentrated sludge production
Ion exchange	Regeneration: no adsorbent loss	Not effective for all dyes
Irradiation	Effective oxidation at lab scale	Requires a lot of dissolved O ₂
Electrokinetic coagulation	Economically feasible	High sludge production

2.4.5 Utilizzo delle laccasi per la decolorazione

Molti studi hanno dimostrato che i funghi *white-rot* possono degradare un'ampia varietà di coloranti strutturalmente differenti come azo, antrachinonici, eterociclici, triarilmetano, etc., utilizzando il loro sistema enzimatico: lignina perossidasi, manganese perossidasi e laccasi (Cripps et al., 1990; Vicun~a et al., 1993; Heinfling et al., 1998; Swamy e Ramsay, 1999; Nyanhongo et al., 2002).

Il sistema lignolitico di *Pleurotus spp* è stato intensamente studiato e sembra rappresentare una buona alternativa per la bioremediation di questi inquinanti (Cohen et al., 2002). Colture sommerse di *Pleurotus sajor-caju* PS2001 sono state saggiate per la decolorazione dei coloranti tessili su piastra. Il fungo è stato coltivato su mezzi formulati con segatura di pino e l'enzima extracellulare prodotto è stato utilizzato per la decolorazione di coloranti tessili in coltura liquida. Coloranti di tipo antrachinonico sono stati utilizzati come substrato per il sistema enzimatico di *Pleurotus sajou-caju*. Le prove su piastra hanno mostrato che il colorante antrachinonico Reactive Blue 220 può agire da mediatore della reazione enzimatica permettendo la degradazione anche di composti azo. Reactive blue 220 e Acid Blue 280 sono completamente decolorati in 30 e 60 minuti, mentre gli azocoloranti mostrano resistenza alla degradazione (Fernanda et al. 2007).

Anche le laccasi prodotte da alcuni funghi white-rot del genere *Trametes* sono state valutate per le loro capacità di degradare alcuni coloranti in presenza e non di mediatori redox (Soares et al., 2001). La laccasi di *T. hirsuta* si è dimostrata capace di degradare coloranti utilizzati in campo tessile di tipo azo, indigo e antrachinonico (Abadulla et al 2000). L'immobilizzazione dell'enzima ha permesso di ottenere una maggiore termostabilità e resistenza verso alcuni inibitori e una riduzione di tossicità dei coloranti fino all'80% (Torres et al., 2003). Il range di substrati e la capacità di decolorazione della laccasi possono essere aumentati includendo nella reazione un mediatore; l'ABTS è uno dei mediatori che sono stati più studiati per questo scopo (Collins et al., 1998).

La possibilità di utilizzare le laccasi nella degradazione di coloranti sintetici, che sono presenti nelle acque reflue di molte industrie, comporta la necessità di trovare le condizioni ottimali per questo processo.

L'esperienza condotta nel nostro laboratorio si è incentrata, in una prima fase, sulla degradazione di tre coloranti da parte della laccasi maggioritaria Lcc1 prodotta dal basidiomicete *T. trogii*, che è stata utilizzata in forma immobilizzata, in presenza o meno di mediatori. In una seconda fase del lavoro un metodo di screening più rapido ha consentito non solo di studiare la degradazione di un numero maggiore di coloranti da parte della laccasi Lcc1 wt in diverse condizioni, ma anche di confrontare questo enzima con forme ricombinanti. È stato inoltre utilizzato un metodo di ottimizzazioni delle variabili nella decolorazione di due coloranti.

2.5 ESPRESSIONE ETEROLOGA

Affinché le laccasi possano essere utilizzate per le applicazioni citate è necessario disporre di notevoli quantità di enzima e possibilmente con caratteristiche vantaggiose dal punto di vista biotecnologico. In questa ottica potrebbe risultare promettente l'uso della tecnologia del DNA ricombinante: il clonaggio di geni che codificano per laccasi e la produzione eterologa di proteine ingegnerizzate offrirebbero la possibilità di ottenere cospicue quantità di enzima a bassi costi e con proprietà appositamente modificate.

La scelta di un sistema di espressione ottimale è molto importante per l'espressione di un gene eterologo. Dopo aver identificato e isolato la sequenza nucleotidica di interesse, è necessario scegliere un vettore idoneo per l'espressione nell'organismo ospite scelto: possono essere impiegati plasmidi, fagi, cosmidi e cromosomi artificiali di origine batterica, di lievito o umana (rispettivamente BAC, YAC e HAC; Ikeno et al., 1998). Alcuni vettori possono integrarsi nel genoma dell'ospite, altri possono essere mantenuti come elementi extracromosomali, anche in diverse centinaia di copie per cellula. Un vettore di espressione deve essere sempre caratterizzato da: un promotore in grado di regolare l'espressione genica, uno o più marcatori di selezione, siti di terminazione della trascrizione, siti multipli di clonaggio.

I microrganismi principalmente utilizzati nell'espressione eterologa sono batteri, come *Escherichia coli*, e lieviti; questi ultimi sono utili soprattutto nei casi in cui le proteine ottenute nei batteri siano instabili o prive di attività biologica. L'utilizzo di lieviti come ospiti per l'espressione eterologa presenta altri vantaggi: questi microrganismi sono in grado di crescere abbastanza velocemente su terreni semplici raggiungendo densità cellulari elevate, ed inoltre sono capaci di dar luogo a modificazioni post-traduzionali, che non si realizzano nei procarioti. Le principali modificazioni apportate comprendono la glicosilazione delle proteine prodotte in forma secreta, la corretta formazione di ponti disolfuro, reazione mediata dall'enzima disolfuro isomerasi e il processamento di sequenze segnale.

Tra i lieviti utilizzati per la produzione di proteine eterologhe vanno ricordati:

- *Saccharomyces cerevisiae*, impiegato da anni nella panificazione e nella produzione di birra;
- *Pichia pastoris*, che può utilizzare metanolo come unica fonte di carbonio;
- *Kluyveromyces lactis*, utilizzato industrialmente per produrre l'enzima β -galattosidasi;

- *Schizosaccharomyces pombe*, lievito che si duplica per fissione anziché per gemmazione;
- *Yarrowia lipolytica*, che utilizza gli alcani come substrato per crescere.

Tra questi, i lieviti comunemente più utilizzati per l'espressione eterologa di geni eucariotici sono *S. cerevisiae* e *P. pastoris*.

S. cerevisiae è un ascomicete unicellulare ampiamente studiato da un punto di vista fisiologico e genetico; queste conoscenze consentono di ottimizzare facilmente la produzione della proteina di interesse (Gellisen et al., 1997). Non sorprende quindi che il primo vaccino prodotto mediante ingegneria genetica e autorizzato dalla FDA per la somministrazione sull'uomo, l'antigene di superficie dell'epatite B, è stato prodotto proprio in questo microrganismo (Valenzuela et al., 1982). Spesso le proteine ricombinanti vengono prodotte in forma secreta, facilitandone la purificazione dal mezzo di coltura. A questo scopo la sequenza genica di interesse viene fusa con quella che codifica per un peptide segnale di secrezione in modo da ottenere una proteina chimerica che è rilasciata nel mezzo di coltura in modo efficiente; particolarmente utilizzato nei vettori di espressione commerciali è il peptide segnale dell' α -factor di *S. cerevisiae*. Tuttavia *S. cerevisiae* presenta alcune limitazioni come ospite per l'espressione di proteine eterologhe. Infatti i livelli di prodotto, ad eccezione di pochi casi, sono generalmente bassi e possono arrivare al massimo al 1-5% del totale delle proteine prodotte ed in alcuni casi il trasferimento di scala del processo di produzione può essere difficile da realizzare (scale-up). Il lievito *S. cerevisiae* è stato utilizzato come ospite per l'espressione di laccasi di alcune specie fungine, ottenendo livelli di proteina ricombinante piuttosto bassi. Le laccasi di *Coriolus hirsutus* sono state le prime ad essere espresse in *S. cerevisiae* (Kojima et al., 1990), ma la presenza della proteina ricombinante è stata analizzata solo tramite un saggio qualitativo in piastra che si basa sulla formazione di aloni colorati attorno alle colonie in seguito all'ossidazione di un substrato cromogenico, il guaiacolo, da parte della laccasi.

Anche il gene *lcc2* del fungo *T. versicolor*, che codifica per la laccasi principale, è stato espresso in *S. cerevisiae* ed è stato osservato che la produzione di enzima attivo dipende in modo significativo dalla temperatura alla quale viene fatto crescere il lievito; in particolare la maggiore produttività si ottiene coltivando il microrganismo a 19°C (Cassland et al., 1999).

Recentemente sono stati espressi in *S. cerevisiae* i cDNA dei geni che codificano per le laccasi di due ascomiceti termofili, *Myceliophthora thermophila* (Bulter et al., 2003) e *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen et al., 2004) che producono enzimi particolarmente interessanti in vista delle applicazioni industriali. Infatti, queste laccasi sono termostabili e

presentano buona attività a valori di pH vicini o superiori alla neutralità; quindi questi enzimi possono operare efficientemente nelle condizioni utilizzate nei processi di decolorazione della pasta di cellulosa e nel risanamento di acque reflue.

Kiiskinen et al (2002) hanno espresso in *S. cerevisiae* il cDNA del gene *lac1*, isolato dal fungo *M. albomyces*, ed hanno considerato l'influenza di peptidi segnale presenti all'estremità N- e C-terminale sui livelli di proteina ricombinante prodotta. L'espressione di *lac1* è stata migliorata utilizzando il peptide segnale dell' α -factor di *S. cerevisiae* per dirigere la secrezione invece del segnale di secrezione nativo. Inoltre è risultato vantaggioso esprimere versioni tronche del gene *lac1* all'estremità 3', suggerendo che *S. cerevisiae* non è in grado di processare correttamente l'estremità C-terminale della proteina.

Bulter et al (2003) hanno ottenuto una laccasi ricombinante esprimendo il cDNA del gene *Mtl*, isolato da *Myceliophthora thermophila* in un ceppo di *S. cerevisiae* incapace di secernere proteasi. Al fine di migliorare i livelli di produzione della laccasi in forma attiva, sono state utilizzate tecniche di evoluzione diretta, impiegando sia metodiche di mutagenesi random, che di ricombinazione in vitro ed in vivo. In questo modo l'attività laccasica secreta è stata migliorata di 170 volte rispetto al livello di partenza. Le modificazioni che determinano l'incremento più significativo nei livelli di produzione introducono all'estremità C-terminale un sito di riconoscimento per la proteasi di lievito Kex2 che consente una corretta maturazione della proteina ricombinante. Infine, il peso molecolare dell'enzima ricombinante prodotto in *S. cerevisiae* è risultato essere ben maggiore rispetto a quello della proteina nativa: questo incremento è dovuto alla iperglicosilazione operata dal lievito.

Piscitelli et al. (2005) hanno studiato l'espressione eterologa di alcune isoforme delle laccasi di *P. ostreatus* sia in *S. cerevisiae* che in *Kluyveromyces lactis*, dimostrando la maggiore efficienza di questo lievito non convenzionale. Infatti, *K. lactis* è un microrganismo che mostra molte qualità positive per la produzione di proteine ricombinanti, quali la capacità di crescere su substrati economici, una bassa repressione da catabolita, una maggiore efficienza di secrezione rispetto a *S. cerevisiae* ed infine eccellenti caratteristiche nello sviluppo di processi fermentativi su larga scala. *S. cerevisiae* si è dimostrato capace di secernere solo scarse quantità di enzima molto iperglicosilato, mentre accade esattamente il contrario per *K. lactis*.

Un'altra interessante alternativa ai sistemi convenzionali è il lievito *Yarrowia lipolytica* che è stato utilizzato come ospite per l'espressione di una laccasi codificata dal gene *lacIIIb* di *T. versicolor* (Jolival et al., 2005). In questo caso il peptide segnale nativo si è dimostrato più efficiente nel dirigere la secrezione rispetto al peptide segnale della proteasi alcalina

esocellulare XPR2, ed i livelli di laccasi ricombinante ottenuti sono superiori a quelli ottenuti in *S. cerevisiae*.

Tuttavia il lievito che produce i livelli di laccasi ricombinante più elevati riportati in letteratura è *P. pastoris*. Questo ascomicete è particolarmente utile per l'espressione di proteine ricombinanti in quanto presenta, come *S. cerevisiae*, tecniche di manipolazione genica semplici e ben caratterizzate, ed inoltre ha il vantaggio di produrre livelli di proteine più elevati.

2.5.1 Espressione in *Pichia Pastoris*

Pichia pastoris, tra i sistemi di espressione eterologa, presenta alcune caratteristiche generali che lo rendono particolarmente interessante:

- può produrre proteine ricombinanti ad alti livelli;
- può introdurre modificazioni post-traduzionali nelle proteine, come la glicosilazione e la formazione di ponti disolfuro analogamente agli eucarioti superiori;
- le proteine, in presenza di un peptide segnale, possono essere secrete.

P. pastoris è un lievito metilotrofo, capace di utilizzare il metanolo come unica fonte di carbonio. Il primo passaggio nel metabolismo del metanolo è catalizzato dall'alcol ossidasi e consiste nella sua ossidazione a formaldeide in presenza d'ossigeno; dal momento che si produce anche perossido d'idrogeno, questa reazione si realizza in organelli specializzati, i perossisomi, che consentono di mantenere separati i prodotti tossici dal resto della cellula. Il gene *AOX 1* codifica per l'alcol ossidasi maggioritaria presente nella cellula; quest'enzima rappresenta circa il 30 % delle proteine totali solubili in cellule cresciute in presenza di metanolo come unica fonte di carbonio. Infatti, l'alcol ossidasi ha una bassa affinità per l'O₂ molecolare e *P. pastoris* produce elevate quantità di quest'enzima per mantenere attivo il metabolismo.

L'espressione di *AOX 1* è sotto il controllo di un promotore fortemente regolato, indotto dalla presenza di metanolo; questo è uno dei promotori più utilizzati nella regolazione dell'espressione di proteine eterologhe in *P. pastoris*. In cellule cresciute in presenza di glucosio questo promotore è represso fortemente, mentre è indotto quando le cellule sono trasferite in un terreno che contiene metanolo come unica fonte di carbonio e la sua espressione incrementa di 1000 volte quando quest'ultimo viene aggiunto al terreno di coltura.

L'espressione di proteine eterologhe in *P. pastoris* può essere sia intracellulare che esocellulare e la secrezione richiede la presenza di un peptide segnale nella proteina espressa

per guidarla alla via secretoria. Sono state utilizzate diverse sequenze che codificano per il segnale di secrezione, quali la sequenza segnale dell' α -factor di *S. cerevisiae*, ma anche sequenze segnale native delle proteine eterologhe d'interesse.

Il vantaggio principale di ottenere proteine eterologhe secrete nel mezzo di coltura è che *P. pastoris* secerne quantità molto basse d'altre proteine native, soprattutto quando il microrganismo è cresciuto in un terreno minimo. In queste condizioni le proteine eterologhe rappresentano la frazione principale delle proteine presenti nel brodo, facilitando notevolmente i passaggi di purificazione.

Negli studi sull'espressione delle sequenze codificanti per le laccasi di *P. sajor-caju* e *T. versicolor* è stato visto che i livelli più elevati di laccasi si ottengono utilizzando il peptide segnale nativo (Jonsson et al., 1997; Gelo-Pujic et al., 1999; Soden et al., 2001). Questo risultato, però, non sembra essere generalizzabile: infatti, nella produzione della laccasi codificata dal gene *lac1* da *P. cinnabarinus* in *P. pastoris*, non si osservano differenze significative utilizzando la sequenza nativa o quella dell' α -factor di lievito (Otterbein et al., 2000). Infine, la caratterizzazione preliminare di alcune di queste laccasi ricombinanti ha mostrato che queste proteine sono quasi sempre iperglicosilate, sia pure in modo inferiore rispetto a quelle prodotte in *S. cerevisiae*. *P. pastoris* realizza, a carico delle proteine secrete, un tipo di glicosilazione N-linked ricca in mannosio, ma la catena oligosaccaridica è molto più corta di quella prodotta da *S. cerevisiae*.

Trasformanti stabili di *P. pastoris* possono essere generati per ricombinazione omologa tra DNA lineare e regioni del genoma dell'ospite con similarità elevata. Questi trasformanti mostrano un'estrema stabilità anche in assenza di pressione selettiva o quando sono presenti copie multiple del gene che codifica per la proteina eterologa.

I vettori di espressione utilizzati in questo lavoro presentano il gene *HIS 4* per la selezione, ed i trasformanti possono essere ottenuti per eventi di inserzione genica al locus *HIS 4* o al locus *AOX 1* dell'ospite; tali eventi possono essere il risultato di uno scambio singolo, oppure di una sostituzione genica che si realizza per doppio scambio.

Sebbene alcune proteine eterologhe siano state prodotte in quantità significative utilizzando colture di *P. pastoris* cresciute in beuta, le produttività più elevate sono di norma ottenibili solo coltivando il microrganismo in fermentatore, in quanto il controllo dei parametri ambientali permette di ottenere colture a densità cellulare più elevate. L'impiego di colture ad alta densità è importante soprattutto nella produzione di proteine secrete, in quanto la concentrazione del prodotto è proporzionale alla concentrazione di cellule presenti nel fermentatore. Infine, la crescita in fermentatore permette di controllare opportunamente i livelli di ossigeno disciolto. Per utilizzare il metanolo, le cellule di *P. pastoris* devono

consumare una grossa quantità di ossigeno e la produzione di proteine ricombinanti è ridotta drasticamente quando i livelli di ossigeno disciolto scendono a valori critici, situazione che può verificarsi con una certa frequenza quando cellule in attiva crescita sono coltivate in beuta.

La modalità di processo che è normalmente utilizzata per la produzione di proteine eterologhe con colture ad alta densità di *P. pastoris* è quella *fed-batch* a tre stadi (Higgins e Cregg, 1998). Per ottenere la produzione della biomassa, il microrganismo viene fatto crescere su un terreno salino con una fonte di carbonio repressiva: glicerolo (Fase 1). Successivamente la coltura viene alimentata con un *feed* di glicerolo al 50% per ottenere un ulteriore incremento della biomassa all'interno del reattore (Fase 2). Infine, la coltura viene alimentata con un *feed* di metanolo, in modo da indurre l'espressione del promotore AOX1 ed ottenere la produzione della proteina ricombinante (Fase 3). La concentrazione di metanolo viene mantenuta costante per tutto il periodo di induzione, in modo da evitarne sia l'accumulo durante la fase iniziale di adattamento al substrato, sia la scomparsa rapida durante le fasi di attivo metabolismo.

Il gene corrispondente alla laccasi maggioritaria di *T. trogii* 201, *lcc1*, è stato isolato, sequenziato ed espresso con successo in *P. pastoris* e la produzione di laccasi ricombinante è stata ottimizzata in condizioni culturali controllate in fermentatore (Colao et al., 2006). Come già detto *T. trogii* secerne nel brodo colturale almeno altre cinque laccasi in piccole quantità. Queste isoforme hanno spesso caratteristiche chimico-fisiche molto simili tra loro rendendo difficile la purificazione dei singoli enzimi per lo studio delle loro proprietà; il problema può essere superato esprimendo i singoli geni in un ospite eterologo. Inoltre l'utilizzo di un sistema di espressione ricombinante consente la produzione di enzimi facilmente purificabili e questo apre la strada ad esperimenti di ingegneria proteica per costruire laccasi con caratteristiche catalitiche più adatte per applicazioni biotecnologiche.

Utilizzando la sequenza di cDNA del gene *lcc1* di *T. trogii* è stato messo a punto un sistema per la produzione eterologa di laccasi fungine nel lievito metilotrofo *P. pastoris*. Sono stati condotti esperimenti al fine di valutare l'effetto del peptide segnale utilizzato per la secrezione della proteina ricombinante e del ceppo di lievito trasformato sui livelli di attività laccasica prodotti. L'analisi della produttività volumetrica e specifica dell'enzima ricombinante mostra che i livelli di laccasi sono almeno quattro volte più elevati quando viene impiegato il peptide segnale nativo, mentre l'uso del ceppo di *P. pastoris* SMD1168, incapace di secernere proteinasi A, non ha dato alcun vantaggio per la produzione di Lcc1. La produttività dell'enzima ricombinante è stata ottimizzata utilizzando colture ad alta densità

cellulare, aumentando il flusso del metanolo aggiunto durante la fase di induzione ed addizionando ossigeno puro alle colture.

Durante questa tesi di dottorato è stata espressa e caratterizzata una nuova laccasi di *T.trogii* (Lcc2) che presenta un'identità del 69.2% con l'isoforma principale; Lcc2 conserva tutti i residui amminoacidici che sembrano essere essenziali per l'attività delle laccasi, come i residui che circondano gli ioni rame e l'aspartico situato nella parte interna della cavità del substrato. L'espressione della laccasi ricombinante Lcc2 è stata ottenuta nelle stesse condizioni utilizzate per Lcc1.

Inoltre sempre durante questo lavoro di tesi sono stati prodotti dei mutanti del gene *lcc1* e anche questi sono stati espressi in *Pichia pastoris*.

2.6 EVOLUZIONE DIRETTA

Gli enzimi espressi dagli organismi viventi sono il risultato dell'evoluzione biologica attraverso milioni di anni. Solo in alcuni casi, questi enzimi naturali sono direttamente utilizzabili per applicazioni biotecnologiche, ma le loro caratteristiche catalitiche possono essere studiate e migliorate attraverso tecniche di ingegneria proteica. Quando le relazioni struttura/funzione delle proteine enzimatiche sono conosciute, è possibile utilizzare un approccio che prevede un disegno razionale e consente di predire quali residui amminoacidici dovranno essere modificati per ottenere le caratteristiche desiderate.

Negli ultimi anni, l'evoluzione diretta è emersa come alternativa all'approccio razionale permettendo il miglioramento di proprietà strutturali e funzionali come la stabilità e l'attività in differenti condizioni (temperature, pH estremi e solventi organici) e alterazioni nella specificità di reazione e substrato. L'evoluzione diretta continua il processo di evoluzione darwiniana e seleziona i mutanti con maggiore fitness da un insieme di varianti con mutazioni random. I mutanti migliorati vengono identificati attraverso lo screening o la selezione di proprietà di interesse e i geni codificanti queste proprietà vengono poi impiegati in ulteriori cicli di evoluzione. Questo approccio è particolarmente vantaggioso nel caso in cui non sono disponibili a priori conoscenze riguardo la struttura proteica o i meccanismi di reazione (Aharoni et al., 2004).

In laboratorio l'evoluzione diretta comprende, come l'evoluzione naturale, due fasi: la generazione della variabilità genetica e la selezione per una particolare funzione. In laboratorio, la variabilità nei geni di interesse è normalmente creata attraverso la mutagenesi random usando metodologie di tipo diverso. Mentre le tecniche per creare diversità genetica

sfruttano meccanismi che possono essere generalizzati, i sistemi per la selezione necessitano di adattamenti e modificazioni differenti per ogni proteina target e scopo. Infatti, il successo della mutagenesi random è dato non solo dalla possibilità di ottenere un numero molto grande di mutanti e quindi nella possibilità di costruire librerie di varianti di grandi dimensioni, ma soprattutto dalla presenza di un metodo di screening/selezione per la funzione desiderata della proteina di interesse che sia rapido ed efficiente.

La creazione di librerie di mutanti mediante metodi non ricombinativi può essere effettuata con la tecnica dell'*error-prone* PCR. Normalmente le reazioni di PCR vengono condotte in condizioni in cui un frammento di DNA possa essere amplificato con alta fedeltà. L'attività 3'→5' esonucleasica intrinseca della DNA polimerasi (detta anche attività *proof-reading*) assicura che l'amplificazione del DNA proceda in maniera accurata. Occasionalmente nucleotidi sbagliati possono essere incorporati durante l'amplificazione, determinando l'insorgere di mutazioni con una frequenza di $0,1-2 \times 10^{-4}$ con la DNA polimerasi di *Thermus aquaticus* (Taq-polimerasi). Questo errore molto piccolo può aumentare fino a 100 volte utilizzando DNA polimerasi prive di attività *proof-reading*, oppure modificando le condizioni di amplificazione. Ad esempio possono essere utilizzate alte concentrazioni di ioni Mg^{++} o Mn^{++} poiché, a determinati livelli di concentrazione salina, una base incorporata erroneamente riesce comunque ad appaiarsi senza distorcere eccessivamente la doppia elica. Oppure si possono adoperare concentrazioni sbilanciate di nucleotidi; infatti se la concentrazione di alcuni nucleotidi, come dCTP e dTTP, è molto più elevata rispetto agli altri, questi verranno inseriti con maggior frequenza. In esperimenti di evoluzione diretta è vantaggioso individuare le condizioni di reazione migliori affinché si ottenga una frequenza di mutazione pari a 2 o 3 nucleotidi per gene che determini in media una sostituzione amminoacidica per enzima mutato. Occorre però tener conto che la creazione di mutazioni mediante *error-prone* PCR non è omogenea per tutti gli amminoacidi a causa della degenerazione del codice genetico, infatti è molto più probabile mutare metionina e triptofano che sono specificati da una sola tripletta, rispettivamente AUG e UGG, rispetto a leucina, serina e arginina che sono codificati ciascuno da 6 triplette.

Per quanto riguarda la creazione di librerie di mutanti mediante metodi ricombinativi, la tecnica più utilizzata è quella del DNA *shuffling* che consiste in un processo controllato di ricombinazione omologa *in vitro* tra geni correlati. I passaggi fondamentali sono i seguenti: i geni vengono digeriti con una DNasi in modo controllato per generare frammenti di circa 50-100 bp; successivamente questi frammenti sono soggetti a cicli ripetuti di denaturazione ed *annealing* ed infine sono sottoposti ad una reazione di amplificazione in presenza della Taq-polimerasi vera e propria per ricostruire l'intera sequenza di interesse. *Error-prone* PCR e

DNA *shuffling* possono essere combinate tra loro per ottenere un più ampio spettro di varianti. Bulter et al. (2003) hanno utilizzato questa strategia sperimentale per ottenere alti livelli d'espressione di una laccasi di *M. thermophila*, insieme ad elevata attività. Per questo scopo hanno utilizzato come ospite *S. cerevisiae* e una metodologia di screening basata sull'attività nativa della proteina. Per ottenere una ricombinazione random delle varianti isolate nei vari passaggi di mutagenesi, sono stati effettuati diversi esperimenti di DNA *shuffling* sia *in vitro* che *in vivo* sfruttando il sistema di riparazione del DNA del lievito (*gap repair*). La laccasi MtL prodotta a livelli elevati in lievito contiene 13 mutazioni: tre di queste sono localizzate nei siti di processamento della proteina che corrispondono alla sequenza segnale di secrezione e sequenza C-terminale. Inoltre è stato dimostrato che la maturazione C-terminale gioca un ruolo importante nella attivazione dell'enzima e che la k_{cat} dell'enzima mutato incrementa di almeno cinque volte.

Recentemente, è stata sviluppata un'altra tecnica di ricombinazione *in vitro*, la ITCHY (*incremental truncation for the creation of hybrid*). Questa tecnica ha il vantaggio, rispetto al DNA *shuffling*, di rendere possibile la ricombinazione di sequenze che non hanno alcun grado di somiglianza. Il processo consiste nel digerire in modo controllato due geni con sequenza non omologa in modo tale da ottenere geni tronchi con delezioni di una sola base, progressivamente più ampie. Successivamente, i frammenti così generati sono sottoposti ad una reazione di ligazione. In questo modo è possibile ottenere geni chimerici che dopo essere espressi in un ospite opportuno sono soggetti a screening. Lo svantaggio di questa tecnica sta nel fatto che la ricombinazione può essere effettuata utilizzando solamente due geni alla volta e quindi le molecole ricombinanti che si formano hanno subito un singolo evento di *crossing-over* (Brocca, 2004).

2.7 MUTAGENESI SITO- DIRETTA

Conoscendo in modo dettagliato la struttura di un enzima e la relazione tra struttura e funzione, si possono utilizzare tecniche di mutagenesi sito-diretta. Questa strategia consente di modificare la struttura di un enzima mediante mutazioni specifiche nella corrispondente sequenza di DNA. E' dunque possibile apportare mutazioni di qualsiasi tipo (sostituzioni, delezioni o inserzioni di uno o più nucleotidi) in qualunque posizione lungo la molecola di DNA. Tuttavia le tecniche di mutagenesi sito-specifica non sempre danno i risultati previsti in quanto, anche quando si conosce il ruolo di ogni singolo amminoacido coinvolto nel

meccanismo catalitico, è difficile prevedere con certezza le modalità con le quali l'amminoacido mutato interagisce con gli altri residui presenti nell'intorno.

Tutte le tecniche di mutagenesi possono essere utilizzate per ottimizzare le proprietà catalitiche di una molecola enzimatica, per migliorarne la termostabilità e per modificare alcuni parametri, quali il potenziale redox ed il pH ottimale. In questo modo sarà possibile ottenere un enzima in grado non solo di catalizzare la reazione di interesse, ma soprattutto capace di essere efficiente nel contesto del processo industriale nel quale dovrà essere utilizzato.

Negli ultimi anni sono stati effettuati alcuni studi di mutagenesi sito-diretta anche sulle laccasi. Al fine di individuare i residui amminoacidici che influenzano il potenziale redox delle laccasi, Xu et al. (1998) hanno effettuato esperimenti di mutagenesi sugli enzimi prodotti da *Rhizoctonia solani* e da *M. thermophila*, due funghi caratterizzati rispettivamente da laccasi con un alto (0,7-0,8 V) e un basso potenziale redox (0,5 V). Le conoscenze sulla struttura della laccasi indicano che i ligandi dello ione rame del sito T1 e la loro coordinazione geometrica potrebbero influire sul potenziale di ossidoriduzione E_0 . Le mutazioni Leu513Phe nella laccasi di *M. thermophila* e Leu470Phe per *R. solani* determinano la sostituzione dell'amminoacido che costituisce uno dei ligandi assiali del rame di tipo 1. In realtà questa mutazione non determina cambiamenti significativi nel potenziale redox o nelle caratteristiche catalitiche dell'enzima. Invece, la tripla mutazione Val509Leu, Ser510Glu, Gly511Ala per la laccasi di *M. thermophila* e Leu466Val., Glu467Ser, Ala468Gly per quella di *R. solani*, che interessano i tre residui adiacenti all'istidina che forma un legame di coordinazione con il rame di tipo 1, determina un significativo decremento nel valore della k_{cat} e della K_M utilizzando sia ABTS che siringaldazina (SGZ) come substrati. Complessivamente, anche le costanti di specificità k_{cat}/K_M dei tripli mutanti sono risultate inferiori rispetto a quelle della laccasi *wild type* o dell'enzima con la mutazione singola. Questo indica che tali mutazioni causano modificazioni strutturali che alterano il riconoscimento tra enzima e substrato determinando una minore specificità ed influenzando il trasferimento degli elettroni tra substrato e rame di tipo 1. Per quanto riguarda lo studio dell'attività enzimatica in funzione del pH, utilizzando come substrato solamente SGZ, è stato evidenziato che la laccasi di *R. solani* presenta un pH ottimale più basso di circa un'unità, quindi più acido, mentre la laccasi di *M. thermophila* ha pH ottimale più basico della proteina *wild type*. Dato che è noto che ioni come OH^- , F^- e CN^- possono inibire l'attività delle laccasi legandosi al cluster trinucleare, è stata valutata anche l'inibizione di questi enzimi mutati da parte degli ioni F^- (Garzillo et al., 1998). Le osservazioni fatte dimostrano che i tripli mutanti presentano una minore inibizione rispetto alla proteina *wild-type* e quindi a bassi valori di pH

la quantità di NaF necessaria per ottenere il 50% di inibizione è più elevata. Solamente un anno dopo, Shimizu et al. (1999) hanno intrapreso uno studio sulla bilirubina ossidasi, un ossidasi blu contenente rame con attività simile alla laccasi, prodotta dal fungo ascomicete *Myrothecium verrucaria*. In questo caso, mutazioni sito-specifiche sono state introdotte per gli aminoacidi che sono i possibili ligandi del rame di tipo 1, di tipo 2 o di tipo 3, consentendo l'analisi di proteine prive alternativamente dei centri T1 e T2 oppure del centro T3. Questi risultati indicano che tutti e tre i centri che coordinano gli atomi di rame devono essere integri affinché si abbia attività enzimatica e che la sequenza His456-Cys457-His458 costituisce il canale di trasferimento degli elettroni dal rame di tipo 1 al cluster trinucleare.

Xu et al. (1999) hanno condotto esperimenti di mutagenesi sito-diretta anche sulla laccasi prodotta dal fungo *T. villosa*. In questo caso, sono state introdotte mutazioni dei seguenti residui amminoacidici: Glu460, Ala461 situati in prossimità del sito T1, e Phe463, il residuo che occupa la posizione assiale del rame del sito T1. I geni corrispondenti a queste proteine mutate sono stati successivamente espressi in *Aspergillus oryzae* e infine caratterizzati. Alcune mutazioni (Phe463Leu e Ala461Glu) non alterano in modo significativo le proprietà strutturali e funzionali della molecola nativa, mentre la mutazione Phe463Met è risultata la più interessante. L'enzima mutato ha mostrato un decremento nel suo potenziale redox pari a 0,1 V ed un notevole aumento delle costanti cinetiche. In particolare la K_M è risultata 5 volte maggiore utilizzando SGZ come substrato e addirittura 38 volte maggiore utilizzando ABTS, mentre la k_{cat} è raddoppiata con ambedue i substrati. Infine è stato osservato un aumento del pH ottimale con SGZ come substrato ma non con ABTS. E' noto che l'ossidazione di un substrato fenolico dipende dal suo grado di protonazione: un fenolo deprotonato ha un potenziale redox più basso e quindi viene ossidato più facilmente. Il fatto che l'attività in funzione del pH sia alterata solamente quando si utilizza la siringaldazina, un substrato fenolico, e non quando si utilizza ABTS, substrato non fenolico, indica che la mutazione potrebbe aver causato un leggero cambiamento nella tasca di legame dell'enzima per il substrato.

Molto più recentemente, Madzak et al. (2006) hanno condotto un processo di mutagenesi sito-diretta su una laccasi prodotta da *T. versicolor* e successivamente espressa nel lievito *Y. lipolytica*. La struttura tridimensionale di questa laccasi è stata determinata dopo cristallizzazione in presenza di 2,5-xilidina, un arilammina, come substrato riducente. Da questo tipo di analisi è stato possibile osservare che la tasca di legame dell'enzima è molto ampia e quindi può ospitare una grande varietà di substrati. Inoltre, la presenza di un arilammina nel sito attivo dell'enzima ha permesso di confermare l'importanza di due residui amminoacidici nell'interazione tra enzima e substrato. Il primo è His458 che forma un legame

di coordinazione con il rame di tipo1 e agisce come accettore primario degli elettroni dal substrato. Il secondo, Asp206, forma un ponte idrogeno tra l'ossigeno terminale della sua catena laterale ed il gruppo amminico della 2,5-xilidina. Questo residuo è relativamente nascosto nella cavità del sito attivo ed è circondato da un certo numero di amminoacidi idrofobici che potrebbero contribuire al posizionamento del substrato nella tasca di legame dell'enzima. Data l'importanza dell'aspartato in posizione 206, è stata valutata la possibilità di sostituire questo residuo con amminoacidi con caratteristiche diverse: alanina, polare e di piccole dimensioni; glutammato, presente nelle laccasi degli ascomiceti e caratterizzato dalla presenza di una carica negativa nella sua catena laterale ed infine asparagina, polare, senza alcuna carica e frequente nella posizione corrispondente delle laccasi vegetali. Per ogni enzima mutato sono state valutate l'attività in funzione del pH, le costanti cinetiche con diversi substrati ed infine la capacità di riconoscere come substrato composti xenobiotici recalcitranti all'ossidazione da parte di questa laccasi. L'analisi della dipendenza dell'attività dal pH ha mostrato che i tre enzimi mutati hanno un profilo simile all'enzima *wild type* quando viene utilizzato come substrato un composto non fenolico come l'ABTS. Al contrario, gli studi condotti con 2,6-dimetossifenolo indicano che solo il profilo del mutante Asp206Glu coincide con quello della laccasi *wild type* e presenta pH ottimale pari a 3.4, mentre per gli altri due enzimi mutati, Asp206Ala e Asp205Asn, la attività più elevata si osserva a valori di pH pari rispettivamente a 4.0 e 4.8. Le costanti cinetiche nei confronti dell'ABTS sono state determinate a pH 3.0 ed i risultati ottenuti mostrano che la mutazione Asp206Ala determina i cambiamenti più significativi nelle proprietà enzimatiche della laccasi che presenta valori di K_M più bassi e k_{cat} più elevata. Invece il mutante Asp206Glu presenta costanti cinetiche simili a quella della proteina nativa, e Asp206Asn ha caratteristiche intermedie tra la laccasi *wild-type* e il mutante Ala. I parametri cinetici con 2,6-dimetossifenolo vengono determinati a pH 3.4, il valore di pH ottimale per la laccasi *wild-type*. I risultati ottenuti mostrano che i valori di k_{cat} non sono influenzati dalle mutazioni introdotte, mentre la K_M dei mutanti Asp206Asn e Asp206Ala è più elevata almeno di un ordine di grandezza rispetto a quella della nativa. Il fatto che sia il profilo di attività in funzione del pH che il valore di K_M del mutante Asp206Glu siano molto simili a quelli dell'enzima *wild-type*, significa che la sostituzione dell'aspartato con glutammato, un amminoacido con catena laterale comunque carica negativamente, non influenza il comportamento dell'enzima, mentre l'aumento del pH ottimale e l'incremento di K_M degli altri due enzimi mutati evidenzia che la sostituzione dell'aspartato con un residuo amminoacidico con catena laterale priva di carica determina interessanti cambiamenti.

3 - MATERIALI E METODI

3.1 COLTURA DEL FUNGO *TRAMETES TROGII*

3.1.1 *Trametes trogii*

Il fungo basidiomicete white-rot *Trametes trogii* 201 (depositato nella collezione DSM, n.11919) è stato originariamente isolato dal Prof. M. Ribaldi dell'Università di Perugia e gentilmente fornito dalla Prof. A. Schiesser dell'Università della Tuscia di Viterbo.

Il micelio di questo fungo è stato conservato su terreno colturale solido costituito da patata destrosio agar, PDA (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) integrato con estratto di lievito 0,5% (Oxoid, Unipath, Basingstoke, UK), in tubi o capsule di Petri ad una temperatura di 4 °C come descritto (Garzillo et al., 1998).

3.1.2 Terreni e condizioni culturali

La precoltura è stata effettuata prelevando 2 cm² di micelio cresciuto su slant in PDA, sospendendolo in 100 ml di terreno liquido costituito da estratto di malto 2% (Acumedia) e Tween80 0,5% in beute da 500 ml, chiuse con tappi aerati sterili, a 28°C sotto agitazione in orbital shaker (180 rpm) e fatto crescere per 5 giorni. Il micelio è stato frammentato a freddo con un Ultra Turrax mixer TP-18N (Ika-Werk Janke & Kunfel, GmbH, Stafenim Breisgan, Germany) al primo, al terzo e al quinto giorno di crescita per pochi secondi al fine di aumentare i centri di accrescimento e rendere il successivo inoculo omogeneo. Le colture del fungo sono state effettuate inoculando con 2 ml di precoltura omogeneizzata beute da 2 l contenenti 500 ml di terreno, mantenendo le stesse condizioni adottate nella precoltura. Per stimolare la produzione di laccasi al terreno è stato aggiunto sterilmente CuSO₄ 64 µM dopo 72h.

Al termine della crescita il brodo colturale viene separato dal micelio mediante tre passaggi di filtrazione: il primo su filtri di carta Whatman, il secondo su filtri in fibra di vetro ed infine, in condizioni sterili, su filtri da 0,45 µm; il brodo è ulteriormente chiarificato per centrifugazione a 10.000 rev/min per 15 minuti. Il supernatante raccolto dopo centrifugazione costituisce il campione di partenza per l'isolamento delle isoforme dopo concentrazione a 4°C sotto pressione d'azoto in celle di ultrafiltrazione Amicon usando membrane in polisulfone (Millipore) a cut-off 30 kDa.

3.2 ESPRESSIONE ETEROLOGA

3.2.1 MICRORGANISMI E CONDIZIONI DI CRESCITA

3.2.1.1 *Escherichia coli*

Per l'amplificazione dei plasmidi ricombinanti pHIL-D2/*mutanti-lcc1*, pHIL-D2/*lcc2* e pPIC9/*lcc2* è stato utilizzato il ceppo di *E. coli* DH5 α^- con il genotipo $F^- \phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k^-, m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda^-$.

Il terreno di coltura utilizzato per la crescita delle cellule batteriche è il terreno ricco di Luria Bertani (LB; Sambrook et al, 1989) la cui composizione è riportata in Tabella 3.1. A questo terreno viene addizionato antibiotico (ampicillina 100 μ g/ml) per la crescita dei trasformanti. I ceppi sono stati fatti crescere in beuta a 37°C in orbital shaker a 180 rpm.

Per le esigenze di lavoro quotidiano, i ceppi sono stati conservati a 4°C su LB agarizzato (1,5% agar). La conservazione di lunga durata è stata effettuata congelando i ceppi a -80°C in terreno LB contenente glicerolo 20%.

Tabella 3.1 - Terreno Luria-Bertani (LB).

Componenti	Quantità
Tryptone	1 %
Estratto di lievito	0,5 %
NaCl	0,5 %

3.2.1.2 *Pichia pastoris*

Il ceppo di *Pichia pastoris* GS115 con genotipo *his 4* è stato acquistato dalla Invitrogen Corporation. Per la crescita delle cellule di lievito sono stati utilizzati vari terreni di coltura, la cui composizione (Tabelle 3.2, 3.3) è descritta nel manuale del *Pichia* Expression Kit (Invitrogen). I ceppi di lievito sono stati fatti crescere in beuta a 30°C in orbital shaker (180 rpm) e sono stati conservati a 4°C su piastre di YPD o MD addizionati con agar al 2%. La conservazione di lunga durata è stata effettuata a -80°C in terreno YPD addizionato con glicerolo (20%).

Tabella 3.2 - Terreno ricco utilizzato per la coltivazione del lievito.

Componenti	YPD
Peptone	2%
Estratto di lievito	1%
Glucosio	2%

Tabella 3.3 - Terreni minimi (M) utilizzati per la coltivazione di *P. pastoris*.

Componenti	MD+S Minimal Dextrose Medium+ Sorbitol	MD Minimal Dextrose Medium	MDH Minimal Dextrose Medium+ His	MM+ABTS Minimal Methanol Medium+ ABTS	MGY Minimal Glycerol Medium
Sorbitolo	1 M				
YNB ¹	1.34%	1.34%	1.34%	1.34%	1.34%
<i>Biotina</i>	4x10 ⁻⁵ %	4x10 ⁻⁵ %	4x10 ⁻⁵ %	4x10 ⁻⁵ %	4x10 ⁻⁵ %
<i>Glucosio</i>	2%	2%	2%		
<i>Istidina</i>			0.004%		
<i>Metanolo</i>				0.5%	
<i>ABTS</i>				0.2 mM	
Glicerolo					1%

¹ Yeast Nitrogen Base con ammonio solfato senza amminoacidi

3.2.2 VETTORI DI ESPRESSIONE

I vettori di espressione utilizzati per il lievito *P. pastoris*, pHIL-D2 e pPIC9 (Invitrogen; Fig. 3.1) presentano il promotore dell'alcol ossidasi *AOX1* (5'-*AOX1*), che consente di ottenere alti livelli di espressione della proteina eterologa utilizzando metanolo come induttore e unica fonte di carbonio. Questi vettori sono dotati di una sequenza di circa 260 bp che comprende il segnale di termine della trascrizione e di poliadenilazione del gene *AOX1* (TT), ed una sequenza di circa 650 bp, che si trova a valle del segnale di terminazione 3'-*AOX1*, e, insieme al 5'-*AOX1*, permette l'integrazione del plasmide ricombinante al livello del locus *AOX1*. La presenza di alcuni siti di restrizione unici consente di linearizzare i vettori per ottenere un'efficiente integrazione nel genoma di *P. pastoris*. I plasmidi pHIL-D2 e pPIC9 presentano: il gene per l'istidinol deidrogenasi (*HIS4*), che consente di complementare la mutazione *his4* presente nel ceppo di *P. pastoris* GS115 e quindi di selezionare i ceppi ricombinanti; un'origine di replicazione per *E. coli* (ColE1) ed il gene che codifica per la β -lattamasi (Amp) che conferisce resistenza all'ampicillina, permettono la selezione, l'amplificazione ed il mantenimento dei plasmidi ricombinanti in *E. coli*. La differenza più importante tra i due vettori è la presenza in pPIC9 della sequenza che codifica per il peptide segnale dell' α -factor di *S. cerevisiae*; il clonaggio in pPIC9 consente di ottenere l'espressione della proteina ricombinante in forma secreta.

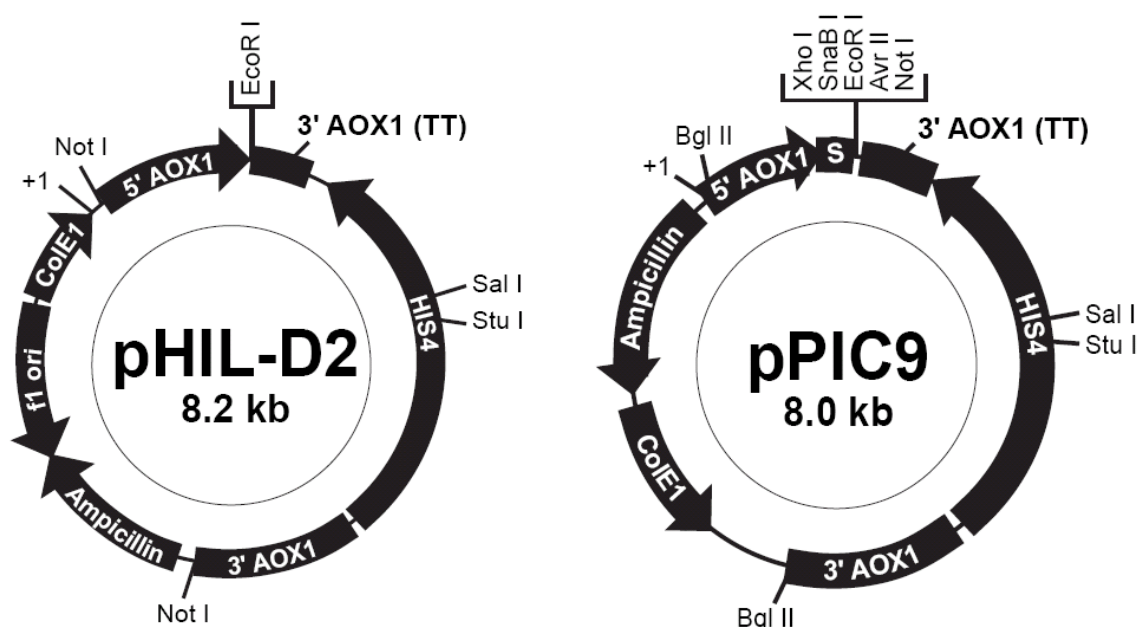


Figura 3.1 – Mappe dei vettori di espressione di *P. pastoris* pHIL-D2 e pPIC9.

3.2.3 TECNICHE DEL DNA RICOMBINANTE

3.2.3.1 Manipolazione del DNA

Per la manipolazione del DNA sono stati seguiti protocolli standard descritti da Sambrook et al. (1989). Gli enzimi di restrizione e la T4 DNA ligasi sono stati utilizzati seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice (Invitrogen, Italia). L'elettroforesi del DNA è stata effettuata su gel di agarosio 1% in tampone TAE (Tris/acetato 40 mM; EDTA 1 mM) e il DNA, dopo colorazione in una soluzione acquosa di bromuro di etidio 0,5 µg/ml, è stato rivelato con luce ultravioletta. La taglia apparente dei frammenti di DNA è stata stimata confrontando la loro mobilità elettroforetica con quella di un marker di peso molecolare noto (frammenti di λ HindIII o 1Kb DNA Ladder – MBI Fermentas, Italia). Per il recupero del DNA da gel di agarosio è stato utilizzato il kit DNA Purification System (Promega), seguendo le istruzioni del produttore.

3.2.3.2 Clonaggio del gene *lcc2*

Per il clonaggio di *lcc2* nei vettori di espressione, il gene è stato amplificato per PCR effettuata con il sistema SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), con primers che presentavano alle estremità 5' il sito di taglio della endonucleasi *EcoRI* e *HindIII*. Le reazioni di amplificazione sono state condotte con coppie di primers degenerati, progettati sulle regioni delle sequenze amminoacidiche conservate che sono coinvolte nel legame degli ioni rame di tipo 1 e di tipo 2 nelle laccasi dei basidiomiceti, mostrati in Tabella 3.4, in modo da ottenere la sequenza di *lcc2*. Le reazioni di PCR sono allestite in un volume finale di 50 µl, utilizzando 2 µl di cDNA di *lcc2* come stampo, 1 µM di ciascun primer, 200 µM di ciascun dNTP e 1,25 U Taq DNA polimerasi (Qiagen, Crawley, Regno Unito).

Tabella 3.4 - Primers utilizzati per le reazioni di PCR.

Nome	Sequenza nucleotidica	Sequenza proteica corrispondente	Descrizione
F	5'-CARTAYTGYTGYGAYGGIYTIMGIGG-3'	QYCDGLRGP	forward primer degenerato
R	5'-TCDATRTGRCARTGIARRAACCC-3'	WFLHCHID	reverse primer degenerato

L'amplificazione è stata effettuata in un termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) con il seguente programma:

- 5 minuti di denaturazione iniziale a 94°C;
- 30 cicli: (denaturazione 45 secondi a 95°C; annealing 45 secondi a 56°C; estensione 90 min a 68°C)
- 7 minuti di estensione finale a 68°C.

Dopo purificazione usando il Wizard SV Kit, i prodotti di PCR sono stati clonati nel vettore pGEM-T Easy secondo le istruzioni del fornitore (Promega, Madison, U.S.A.). I plasmidi derivati dal clonaggio sono stati verificati tramite digestione di restrizione con *EcoRI* e sono stati sequenziati per verificare l'assenza di eventuali errori introdotti dalla *Taq* DNA polimerasi. La Sequenza è stato realizzata su un'apparecchiatura ABI 310 usando il sistema BigDye Sequencing Chemistry (Applied Biosystems, Foster City, USA).

3.2.3.3 Amplificazione dell'intera sequenza del gene *lcc2*

Per ottenere l'estremità 3' del DNA di *lcc2*, è stata effettuata la 3'-RACE usando lo SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, USA). Un primer specifico (5'-GAGAAGGTGAAGTTGGGGTCGCAAG-3') per la RACE-PCR è stato progettato in base alla sequenza del frammento del gene ottenuta sopra. I prodotti della RACE-PCR sono stati amplificati sul cDNA secondo le istruzioni del fornitore e poi sono stati sequenziati. Per l'isolamento delle estremità 5', un primer disegnato per legarsi alla

regione ATG (5'-GAGCAAGTTCCAGTCCCTCGCTGCC-3') è stato disegnato in base alle sequenze presenti nella banca dati con un alto grado di omologia con la sequenza 3' conosciuta di *lcc2*. Il cDNA totale è stato generato per mezzo del primer forward (5'-ATGAGCAAGTTCCAGTCCCTCGC-3') e il primer reverse (5'-AGTCGGGCAAGCTGTTACCCGG-3') progettato dalle sequenze delle estremità 5' e 3'. Per ogni amplificazione sono stati usati come stampo 20 ng di DNA genomico o 2 µl cDNA in 50 µl di miscela di reazioni di PCR contenente 1 µM di ogni primer e 1.25 U di Taq DNA polimerasi.

L'amplificazione è stata effettuata con una denaturazione iniziale (5 minuti a 94°C), 30 cicli (30 s a 95°C; 90 s a 68°C) e ad un allungamento finale (7 minuti a 68°C). Il cDNA ORF della laccasi *lcc2* di *T. trogii*. è stato clonato e sequenziato.

3.2.3.4 Mutagenesi sito-diretta di *lcc1*

Per generare le mutazioni sito-specifiche, Asp205Cys, Asp205Ser ed Asp205Lys sono stati sintetizzati degli oligonucleotidi mutageni. I mutanti sono stati costruiti usando il sistema di mutagenesi GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen).

Il plasmide pGEM-T easy (3015bp) contenente l'intero gene *lcc1* (1554 bp), è stato metilato con la DNA metilasi a 37°C per 1h, poi successivamente è stato amplificato in una reazione di mutagenesi con due primer specifici, uno dei quali conteneva la mutazione specifica. Il prodotto è un DNA lineare a doppio filamento contenente la mutazione. La miscela di mutagenesi è stata utilizzata per trasformare *E.coli*. Questa cellula ospite circolarizza il DNA lineare mutato e l'endonucleasi *McrBC* della cellula ospite digerisce il DNA metilato stampo, lasciando soltanto il prodotto mutato non metilato.

3.2.3.5 Clonaggio nei vettori di espressione

La regione codificante del gene *lcc2* è stata amplificata per PCR. Le reazioni di amplificazione sono state condotte con le coppie di primers mostrate in 3.5, in modo da ottenere la sequenza di *lcc2* con (primers 2E3, 2E4; *n-lcc2*) e senza (primer 2E4, 2E5; δ SP-*lcc2*) il peptide segnale nativo. Le reazioni di PCR sono allestite in un volume finale di 50 µl, utilizzando il cDNA di *lcc2* come stampo, 1 µM di ciascun primer, 5 µl di 10× *Ex Taq* Buffer (con Mg^{2+}), 200 µM di ciascun dNTP e 1,25 U di *TaKaRa Ex Taq* (TaKaRa). Il frammento di restrizione *EcoRI-HindIII* corrispondente a *lcc2* con il peptide segnale nativo (*n-lcc2*) è stato quindi recuperato da pGEM-T/*n-lcc2* come frammento *EcoRI-EcoRI* e clonato a valle del promotore *AOX1* nel sito unico *EcoRI* del vettore pHIL-D2. La sequenza di *lcc2 EcoRI-EcoRI* priva del peptide segnale (δ SP-*lcc2*) è stata invece clonata nel vettore pPIC9.

L'orientamento dell'inserto nei costrutti pHIL-D2/*n-lcc2*, pPIC9/ α -*lcc2* è stato verificato tramite analisi di restrizione e la giunzione del cDNA di *lcc2* con il peptide segnale dell' α -factor in pPIC9/ α -*lcc2* è stata verificata tramite una reazione di sequenza.

I vettori pGEM-T ottenuti dagli esperimenti di mutagenesi contenenti i geni mutanti sono stati anche essi digeriti *EcoRI-EcoRI* e clonati a valle del promotore *AOX1* nel sito unico *EcoRI* del vettore pHIL-D2.

I plasmidi recombinanti ottenuti, pHIL-D2/D205S, pHIL-D2/D205C, pHIL-D2/D205K, pHIL-D2/*lcc2* e pPIC9/*lcc2*, sono stati digeriti con *StuI* e *NcoI*, prima della trasformazione di cellule elettrocompetenti di *P.pastoris*.

Tabella 3.5 - Primers per l'amplificazione di *lcc2*.

Nome	Sequenza	Descrizione
2E3	5' - GAATTC ATGAGCAAGTTCCAGTCCC - 3'	Forward primer per l'amplificazione a partire dall'ATG contenente il peptide segnale
2E4	5' - AAGCTTTCACCGGCGCGCGTCGCCG - 3'	Reverse primer per l'amplificazione fino allo stop codon
2E5	5' - GAATTC GCCATCGGTCCCACCGCCG - 3'	Forward primer per l'amplificazione di <i>lcc2</i> privo del peptide segnale nativo

3.2.3.6 Preparazione delle cellule competenti e trasformazione di *E. coli* DH5 α

La preparazione delle cellule competenti di *E. coli* è stata effettuata con il trattamento con sali di calcio (Mandel e Higa, 1970). In un esperimento tipico, 30 ml di terreno LB vengono trasferiti sterilmente in una beuta da 250 ml e inoculati con 600 μ l di una precoltura *overnight*. La coltura viene messa ad incubare in orbital shaker (180 rpm) a 37°C fino a quando la sua assorbanza raggiungeva un valore di OD_{600nm} compreso tra 0.4 e 0.6 (circa 2 ore). Le cellule vengono quindi raccolte per centrifugazione, risospese in 15 ml di una soluzione sterile di CaCl₂ (100 mM CaCl₂ - 10mM Tris/HCl pH 7.4) preraffreddata, e messe ad incubare in ghiaccio per 30 minuti. Le cellule vengono successivamente raccolte per

centrifugazione, risospese in soluzione di CaCl_2 (800 μl) ed utilizzate per la trasformazione. La sospensione cellulare (100 μl) viene poi incubata in ghiaccio per 30 minuti in presenza di DNA plasmidico, sottoposta a shock termico per 45 secondi a 42°C , trasferita nuovamente in ghiaccio per 5 minuti ed infine, dopo essere stata diluita con 1 ml di terreno LB, messa ad incubare a 37°C per 20 minuti. Per la selezione dei trasformanti, le cellule vengono piastrate su terreno LB agarizzato contenente ampicillina (100 $\mu\text{g/ml}$). La caratterizzazione dei cloni viene condotta mediante analisi di restrizione dei plasmidi ricombinanti

3.2.3.7 Estrazione e purificazione del DNA plasmidico da *E. coli*

Per la preparazione del DNA plasmidico è stata utilizzata la procedura della lisi alcalina (Birnboim, 1983). Le cellule contenenti il plasmide vengono raccolte per centrifugazione da una coltura cresciuta 16-18 ore (1.5 ml) in terreno selettivo e risospese in 100 μl di tampone Tris/HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM e glucosio 50 mM. Le cellule sono poi lisate in una soluzione alcalina in presenza di detergente costituita da NaOH 0.2 N e SDS 1%. Dopo 5 minuti di incubazione in ghiaccio, l'aggiunta di 150 μl di una soluzione acida di potassio acetato (CH_3COOK 3 M; HCOOH 1,8 M) neutralizza gli alcali precedentemente aggiunti e fa precipitare il DNA cromosomale, parte dell'RNA e le proteine. Dopo centrifugazione, il DNA plasmidico contenuto nel sopranatante viene precipitato con l'aggiunta di 2.5 volumi di etanolo 96 % a -20°C per 20 minuti, viene poi lavato con $\frac{1}{2}$ volume di etanolo al 70% per rimuovere i sali, asciugato a 37°C e risospeso in acqua distillata sterile. La concentrazione del campione di DNA e la sua purezza sono state valutate mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

3.2.4 TRASFORMAZIONE DI *PICHA PASTORIS*

3.2.4.1 Preparazione delle cellule elettrocompetenti e trasformazione

Le cellule di *P. pastoris* GS115 (*his4*) sono state trasformate tramite la tecnica dell'elettroporazione. Le cellule di lievito sono raccolte durante la fase esponenziale tardiva, concentrate e risospese in un mezzo isosmotico in presenza del DNA plasmidico. L'ingresso del DNA all'interno delle cellule è determinato da una scarica elettrica ad alto voltaggio (Lundblad, 1997).

Una beuta da 1 l contenente 200 ml di terreno YPD è inoculata con 25-50 µl di una coltura fresca e incubata a 30°C in orbital shaker a 180 rpm per 16-18 ore finché non raggiunge un valore di assorbanza a 600 nm compreso tra 1.3 e 1.5. Le cellule vengono recuperate per centrifugazione e lavate una prima volta con 200 ml e una seconda volta con 100 ml di acqua distillata sterile preraffreddata. Le cellule così trattate sono risospese prima in 10 ml di sorbitolo 1 M preraffreddato, recuperate e poi risospese in 1 ml circa di sorbitolo; 80µl di questa sospensione vengono uniti a 5 µl di DNA e lasciati in ghiaccio per 5 minuti. In parallelo i vettori pHIL-D2 e pPIC9 privi di inserto vengono utilizzati per trasformare cellule competenti di lievito, ed i trasformanti sono utilizzati come controllo negli esperimenti di espressione eterologa. Le cellule sono poi trasferite nelle cuvette, sottoposte ad elettroporazione (1.5 kV, 25 µF e 200 Ohm) in un apparecchio Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA), diluite aggiungendo rapidamente 1ml di sorbitolo 1M, ed infine piastrate su terreno selettivo, Minimal Dextrose Medium con sorbitolo (MD+S) e incubate a 30°C per 48-72h.

3.2.4.2 Screening dei trasformanti di lievito

Lo screening dei trasformanti è stato effettuato trasferendoli, dopo 48 ÷ 72 ore, su piastre di terreno selettivo che consente di indurre l'espressione della proteina eterologa. Questo terreno, Minimal Methanol Medium con ABTS (MM + ABTS) contiene un substrato cromogenico, l'ABTS, che permette, attraverso la formazione di aloni colorati intorno alle colonie, di verificare se la laccasi ricombinante viene prodotta e secreta in forma attiva. 100 µl di metanolo vengono aggiunti giornalmente sul coperchio delle piastre per mantenere un'adequata concentrazione della fonte di carbonio. Più del 90% dei trasformanti sono risultati positivi per l'attività laccasica, mentre nessun clone positivo è stato rilevato quando le cellule GS115 sono state trasformate con i vettori linearizzati come controllo.

3.2.4.3 Estrazione e purificazione del DNA plasmidico da *P. pastoris*

L'estrazione del DNA plasmidico da lievito prevede prima la preparazione degli sferoplasti mediante trattamento con zimoliasi e poi un trattamento di lisi alcalina simile a quello descritto per le cellule batteriche modificando il metodo descritto da Filetici et al. (1985). Le cellule di lievito provenienti da una coltura di 16-18 ore in 5 ml di terreno YPD vengono raccolte per centrifugazione, lavate con 1 ml di sorbitolo 1M, e risospese in 200 µl di

una soluzione contenente sorbitolo 0.9 M, EDTA 0.1 M, NaP 0.05 M pH 7.5 e β -mercaptoetanolo 14 mM a cui vengono di seguito aggiunti 50 μ l di zimoliasi (2 mg/ml). Successivamente le cellule vengono incubate a 37°C per 30 minuti e la formazione degli sferoplasti viene seguita con l'aiuto del microscopio. A questo punto la purificazione del DNA genomico viene effettuata utilizzando il Genomic DNA Purification Kit della Fermentas seguendo le istruzioni della casa produttrice. 200 μ l del campione vengono miscelati con 400 μ l di lysis solution e incubati a 65°C per 5 minuti. Poi si aggiungono 600 μ l di cloroformio e si emulsiona agitando lentamente. Si centrifuga a 10000 rpm per 5 minuti, si recupera la fase acquosa superiore, si trasferisce in un tubo nuovo e si aggiungono 800 μ l di precipitation solution (720 μ l di acqua deionizzata sterile, 80 μ l di precipitation solution 10X). Si miscela il tutto e si incuba a temperatura ambiente per 2 minuti. Dopo centrifugazione a 10000 rpm per 2 minuti si rimuove completamente il sovrantante e si dissolve il pellet di DNA in NaCl 1,2 M e si aggiunge Ribonucleasi A incubando per 10 minuti a 37°C per eliminare le tracce di RNA. Poi si aggiungono 300 μ l di etanolo al 96% freddo e si lascia precipitare il DNA a -20°C per 20 minuti, si lava poi con 300 μ l di etanolo al 70% per rimuovere i sali, si lascia asciugare a 37°C e si risospende in 20 μ l di acqua distillata sterile.

3.2.5 ESPERIMENTI IN FERMENTATORE

3.2.5.1 Fermentatore

E' stato utilizzato un fermentatore da banco da 2 litri della Applikon Italia (Fig. 3.2) che permette il controllo dei seguenti parametri: temperatura, pH, ossigeno disciolto, velocità della girante. Un bioprocessore, collegato al fermentatore, controlla e mantiene i parametri ai valori desiderati durante la fermentazione. La temperatura è mantenuta costante tramite un flusso di acqua proveniente da un termostato a circolazione esterna. Il valore di pH viene misurato da un elettrodo specifico e mantenuto costante tramite l'aggiunta di una soluzione alcalina. L'elettrodo ad ossigeno misura costantemente l'O₂ disciolto. Tale valore viene espresso in percentuale ed è considerato uguale a 100 all'inizio della fermentazione. Esso tende ad abbassarsi durante la fermentazione, ma può essere mantenuto costante aumentando la velocità della girante, aumentando il flusso di aria, o attraverso l'immissione di O₂. La quantità di aria ed eventualmente di O₂ è regolata da un flussimetro, e la velocità della girante è controllata manualmente attraverso un contagiri. Durante le fasi di accrescimento in

fed-batch la fonte di carbonio viene aggiunta utilizzando una pompa peristaltica con flusso variabile. Il fermentatore è inoltre dotato di un sistema di prelievo che permette di realizzare campionamenti quando necessario per la valutazione della biomassa e delle proteine prodotte dai lieviti ricombinanti.

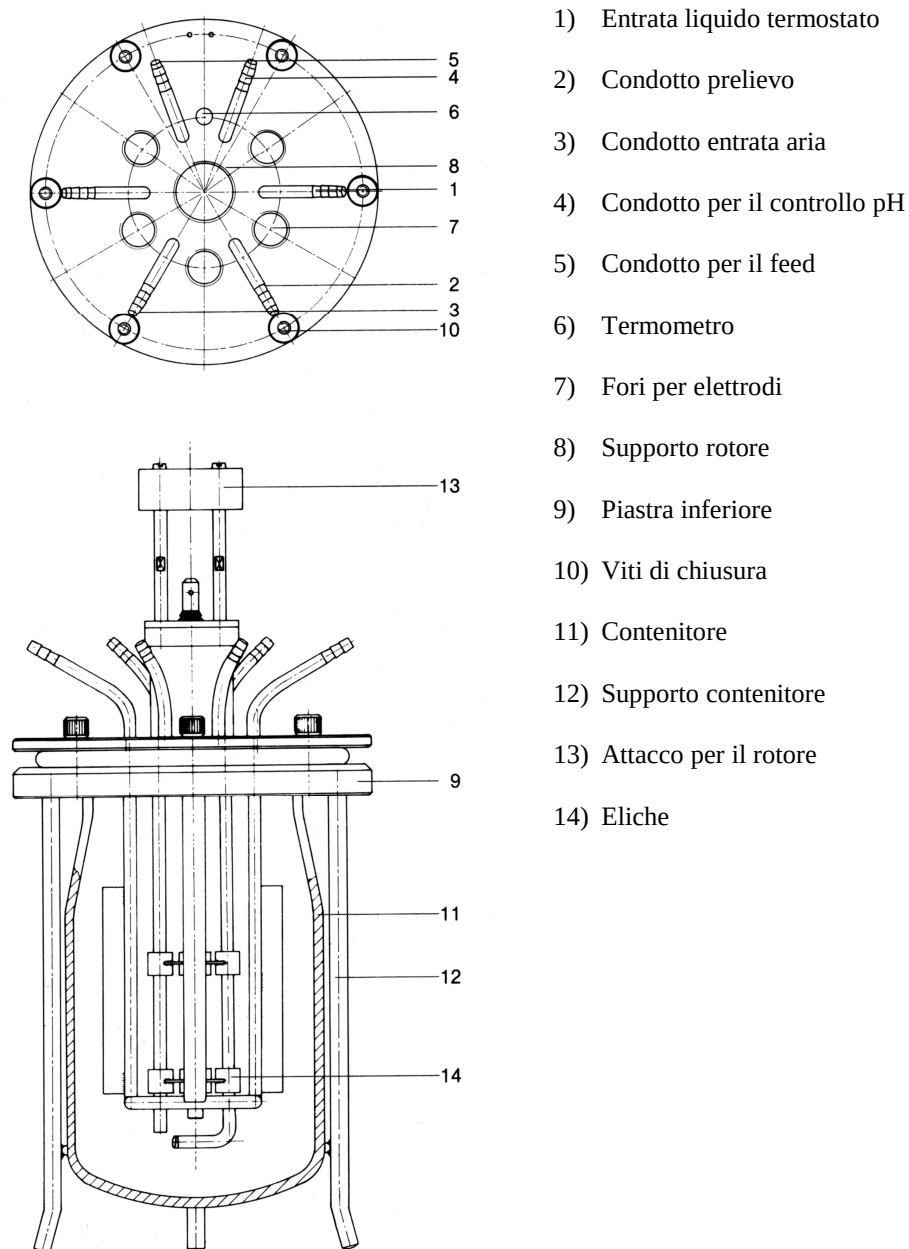


Figura 3.2 - Schema del fermentatore da 2 litri

3.2.5.2 Prove di fermentazione con ceppi ricombinanti mutati di *P. pastoris*

Gli esperimenti di produzione di laccasi ricombinante in fermentatore sono stati condotti per i cloni di GS115 mutati Asp205Cys, Asp205Ser ed Asp205Lys e per la laccasi minoritaria Lcc2.

Le prove di fermentazione sono state effettuate seguendo le linee guida indicate dalla Invitrogen nel manuale *Pichia Fermentation Process Guidelines*. I parametri di fermentazione sono indicati in Tabella 3.6 e la composizione del terreno di fermentazione è riportata in Tabella 3.7.

La precoltura per la semina del fermentatore è stata preparata in terreno MGY (50 ml), utilizzando, per l'inoculo, cellule prelevate da una piastra MM. I parametri di fermentazione all'inizio del processo erano: temperatura, 25°C; pH, 5.0; aerazione, 1.5 vvm; velocità della girante, 750 rpm. Per contrastare la tendenza di *P. pastoris* di acidificare il terreno di coltura durante la crescita, il pH del mezzo viene mantenuto costante, in modo automatico, tramite aggiunta di idrossido di ammonio al 28%. Aerazione e velocità della girante sono aumentate gradualmente in modo manuale per mantenere la concentrazione di O₂ disciolto al di sopra del 20%.

Dopo sterilizzazione a 121°C per 30 minuti, il terreno viene portato a pH 5.0 (30°C), con idrossido di ammonio 28%, ed emendato sterilmente con 1 ml di antischiuma (Antifoam 204, Sigma) e 4.35 ml di soluzione PTM1 Trace Salts per litro di brodo (Tabella 3.8).

Nella fermentazione effettuata in condizioni ottimizzate, la temperatura viene aumentata a 30°C e, quando necessario, viene aggiunto O₂ ad un flusso pari a 0,05 – 0,2 vvm.

La strategia di fermentazione utilizzata prevede tre fasi:

1. accrescimento in batch su glicerolo;
2. accrescimento in fed-batch con glicerolo (feed di glicerolo 50 % ad un flusso di 10 ml/h per litro di brodo di fermentazione);
3. accrescimento in fed-batch con metanolo (feed di metanolo 50 % al un flusso di 3–6 ml/h per litro di brodo di fermentazione).

Tabella 3.6 - Parametri di fermentazione per *P. pastoris*

<i>Parametro</i>	Valore
<i>Volume di lavoro</i>	1.1 litri
Temperatura	25–30°C
Ossigeno disciolto	> 20%
pH	5.0
Agitazione	750-900 rpm
<i>Aerazione</i>	1.5–2.5 vvm

Tabella 3.7 - Composizione del terreno (BS) utilizzato per la crescita in fermentatore del ceppo ricombinante di *P. pastoris* (composizione per litro di terreno)

Fermentation Basal Salt (BS) Medium	
Acido fosforico 85%	26.7 ml
Solfato di calcio	0.93 g
Solfato di potassio	18.2 g
Solfato di magnesio – 7H ₂ O	14.9 g
Idrossido di potassio	4.13 g
Glicerolo	40.0 g

Tabella 3.8 - Composizione della soluzione PMT1 Trace Salts

PTM₁ Trace Salts (per litro)	
Solfato di rame – 5H ₂ O	6.0 g
Ioduro di sodio	0.08 g
Manganese solfato - H ₂ O	3.0 g
Sodio molibdato – 2H ₂ O	0.2 g
Acido borico	0.02 g
Cobalto cloruro	0.5 g
Zinco cloruro	20.0 g
Solfato di ferro – 7H ₂ O	65.0 g
Biotina	0.2 g
Acido solforico	5.0 ml

3.2.5.3 Determinazione della biomassa, dell'attività laccasica e del contenuto proteico

La determinazione della biomassa, come peso secco, è stata effettuata su campioni di brodo colturale da 1 ml; per ciascuna determinazione sono state effettuate almeno tre repliche. Le cellule sono state separate dal mezzo di coltura mediante centrifugazione (per 5 minuti a 13000 g) ed i pellets cellulari sono stati essiccati a 110°C per 24 ore prima di essere pesati.

L'attività laccasica presente nei brodi di coltura è stata misurata tramite un saggio spettrofotometrico seguendo l'incremento di assorbanza a 420 nm dovuto all'ossidazione del substrato ABTS ed espressa in U.I.. La concentrazione proteica è stata determinata usando il metodo descritto da Bradford.

3.3 ANALISI BIOCHIMICA E MOLECOLARE DELLE LACCASI PRODOTTE DAL FUNGO *T.TROGII* E DELLE LACCASI RICOMBINANTI

3.3.1 PURIFICAZIONE DEGLI ENZIMI

3.3.1.1 Cromatografia *in batch* di scambio ionico

Il brodo di coltura, che solitamente ha un pH leggermente acido, viene portato a pH 6.0 e posto a contatto, per circa dodici ore, con la resina, precedentemente equilibrata allo stesso pH con tampone imidazolo/HCl 10 mM pH 6.0, sotto lenta agitazione. Successivamente la resina viene lasciata decantare e viene allontanato il surnatante. Le proteine adese alla resina vengono recuperate aggiungendo una soluzione salina di NaCl 2M disciolto nello stesso tampone e successivamente centrifugando a 12000 rpm per evitare la presenza di tracce di resina nel surnatante. Questo passaggio preliminare ha lo scopo di allontanare parzialmente i fenoli presenti nel brodo che potrebbero causare interferenze nel legame delle proteine alla resina nella cromatografia in colonna e di concentrare ulteriormente il campione.

3.3.1.2 Cromatografia di scambio ionico su colonna

Il concentrato proteico è stato sottoposto a una seconda cromatografia a scambio ionico su resina Q-Sepharose Fast Flow su una colonna (1 cm x 30 cm, Pharmacia) connessa ad un apparato FPLC (Pharmacia) e precedentemente equilibrata con lo stesso tampone; l'eluizione delle proteine è ottenuta applicando un flusso di 2 ml/min. Dopo un lavaggio iniziale, pari a 3

volumi di colonna, l'eluizione delle isoforme si ottiene con un programma che prevede un gradiente salino di NaCl 2M a gradini con i seguenti passaggi: da 0 M a 0,16 M di NaCl in due volumi di colonna; 0,16 M per altri due volumi; 0,16 M a 0,26 M in due volumi di colonna; invariato a 0,26 M per ulteriori due volumi di colonna; in altri due letti di colonna sale a 0,34 M e vi rimane per un ulteriore letto di colonna; si prosegue allo stesso modo per concentrazioni di NaCl pari a 0,5 M, 1 M e 2 M, per terminare con due letti di colonna al 100% di NaCl.

Per la purificazione delle forme ricombinanti si usa un profilo di eluizione che prevede dopo un lavaggio iniziale, pari a 2 volumi di colonna, un gradiente salino di NaCl 2 M che va da 0 a 0,4 M in 7 volumi di colonna e da 0,4 a 2 M in 0.3 volumi di colonna.

Il profilo cromatografico si ottiene monitorando l'assorbanza dell'eluato a 280 nm e l'attività fenolossidasi viene rilevata con saggi enzimatici usando come substrato l'ABTS. Le frazioni (1 o 2 ml ciascuna) che contengono le proteine eluite vengono riunite, concentrate ed equilibrate in tampone sodio/fosfato 0,1 M pH 6.0.

3.3.1.3 Cromatografia di interazione idrofobica

Per purificare ulteriormente le isoforme laccasiche, ciascuna frazione enzimatica è stata concentrata ed equilibrata in tampone Imidazolo 10 mM a pH 6.0 contenente ammonio solfato 1,7 M, in Amicon (con membrana da 30kDA di cut-off); successivamente ogni singola frazione è stata sottoposta a cromatografia di interazione idrofobica su una colonna da 20 ml impaccata con resina Phenyl-Sepharose (Pharmacia), precedentemente equilibrata con lo stesso tampone, connessa ad un sistema FPLC (Pharmacia).

L'eluizione è effettuata ad un flusso di 1 ml/min, utilizzando un gradiente decrescente di forza ionica generato dal tampone imidazolo pH 6.0 con ammonio solfato 1,7 M (tampone A) e dal tampone imidazolo pH 6.0 privo del sale (tampone B).

Il programma di eluizione prevede: un lavaggio iniziale pari a 3 volumi di colonna, poi le proteine vengono eluite con gradiente salino decrescente (da 1,7 M a 0 M) in 8 volumi di colonna e infine la concentrazione di ammonio solfato aumenta e torna a quella iniziale in 2 volumi di colonna.

L'eluato viene raccolto in frazioni ciascuna da 2 ml. L'attività enzimatica di ciascuna frazione viene determinata spettrofotometricamente usando ABTS come substrato; infine vengono riunite insieme le frazioni che corrispondono al picco di massima attività.

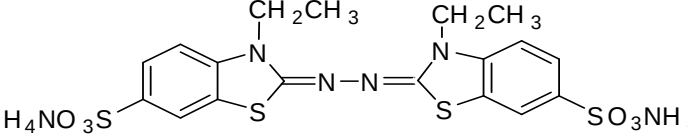
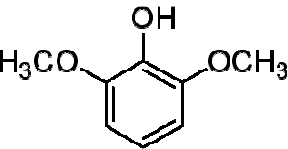
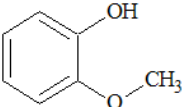
3.3.2 CARATTERIZZAZIONE DEGLI ENZIMI

3.3.2.1 Dosaggio di attività enzimatica

I saggi di routine per valutare l'attività enzimatica sui brodi di coltura del fungo e sulle frazioni ottenute dalla cromatografia sono stati effettuati spettrofotometricamente (UV/VIS Lambda 20, Perkin Elmer) a temperatura ambiente usando i tre diversi substrati cromogenici, due di tipo fenolico e uno non fenolico, nelle concentrazioni indicate (Tabella 3.8), in una soluzione di tampone di McIlvaine (acido citrico 0,1M / K₂HPO₄ 0,2M) a pH 3.4. Per ogni substrato, seguendo l'incremento di assorbimento alla lunghezza d'onda specifica, si è determinata la concentrazione di prodotto ossidato in base alla legge di Lambert-Beer e quindi si sono calcolate le unità enzimatiche internazionali (U.I.) tramite la relazione:

$$UI/ml = \frac{\Delta A/min}{\epsilon^{mM}} \cdot \frac{Vol_{tot}}{Vol_{enzima}}$$

Tabella 3.8 – Substrati per la determinazione dell'attività enzimatica

	Acido 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolin- 6-sulfonico] (ABTS)	$\lambda = 420 \text{ nm}$ $\epsilon = 36,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ concentrazione finale nel saggio 2mM
	2,6- dimetossife nolo (DMP)	$\lambda = 468 \text{ nm}$ $\epsilon = 27,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ concentrazione finale nel saggio 5mM
	2-metossifenolo (Guaiacolo)	$\lambda = 470 \text{ nm}$ $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ concentrazione finale nel saggio 5mM

3.3.2.2 Dosaggio proteico

La concentrazione proteica delle diverse isoforme è stata determinata usando albumina serica bovina (BSA) come standard e Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce), secondo il metodo descritto da Bradford (1976).

Conoscendo la quantità di proteina presente nel campione è anche possibile determinare l'attività specifica dell'enzima, che rappresenta un suo indice di purificazione, definita come unità enzimatiche su milligrammi di proteina nel campione: A.S.= U.I./mg .

3.3.2.3 Curve d'attività in funzione del pH

Le curve d'attività in funzione del pH per le isoforme laccasiche e per le laccasi ricombinanti sono state determinate in tampone McIlvaine, costituito da una miscela d'acido citrico 0,1 M e Na₂HPO₄ 0,2 M in proporzioni variabili per ottenere un valore di pH compreso tra 2.5 e 7.0; utilizzando un substrato non fenolico (ABTS) e due di tipo fenolico (DMP e guaiacolo). I valori d'attività percentuale sono ottenuti dal rapporto tra (U/ml)/(U/ml max).

3.3.2.4 Attività in presenza di alogenuri

L'inibizione dell'attività laccasica da parte degli alogenuri (Cl⁻, F⁻, Br⁻) è stata determinata seguendo il consumo iniziale di ossigeno con un elettrodo a O₂ (HANSATECH modello DW1/AD) connesso ad un registratore. La miscela di reazione (1ml) era costituita da tampone di McIlvaine pH 3.4 in cui era sciolto il substrato fenolico DMP 20 mM, termostatata a 25 °C prima dell'aggiunta dell'enzima. Le unità enzimatiche sono state calcolate tenendo conto che in 1 ml di acqua a 25° C sono presenti 0,253 micromoli di ossigeno disciolto. La concentrazione di alogenuri con la quale si ottiene un'inibizione dell'attività enzimatica del 50% (I₅₀) è stata determinata da grafici in cui viene riportata la percentuale di attività enzimatica in funzione della concentrazione dell'inibitore: da 0 a 100 µM per gli ioni F⁻, da 0 a 80 mM per gli ioni Cl⁻ e da 0 a 600 mM per gli ioni Br⁻.

3.3.2.5 Determinazione delle costanti cinetiche

I saggi d'attività per la determinazione dei parametri cinetici sono stati realizzati in tampone McIlvaine costituito da una miscela d'acido citrico 0,1 M e Na₂HPO₄ 0,2 M in proporzioni variabili per ottenere un valore di pH compreso tra 2.5 e 7.5, facendo variare la concentrazione di ciascun substrato (ABTS, DMP e guaiacolo) da K_M/4 a 8K_M. Le costanti cinetiche vengono calcolate con il programma di regressione non lineare WinCurveFit (Kevin Raner Software, version 1.1.8) che utilizza l'equazione di Michaelis–Menten per fornire stime ottimali di K_M e V_{max} con le relative deviazioni standard. Da queste sono poi state ricavate le altre costanti cinetiche k_{cat} e k_A:

$$k_{cat} = V_{max} / [E]_{tot}$$

$$k_A = k_{cat} / K_M$$

3.3.2.6 Elettroforesi su gel di poliacrilammide

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide (7.5%) in sodio dedecil solfato 0,1% (SDS-PAGE) è stata effettuata secondo quanto descritto da Laemmli (1970) su un apparecchio Mini-Protean III (BioRad). L'elettroforesi in condizioni non denaturanti è stata effettuata su un gel al 12% in modo analogo alla SDS-PAGE utilizzando un tampone di caricamento privo di agente riducente ed evitando di bollire i campioni.

Il peso molecolare delle bande proteiche è stimato per comparazione con il kit Prestained SDS-PAGE Standards Low Range, (BioRad) costituito da una miscela di proteine che comprende: fosforilasi B (116 kDa), albumina di siero bovino (80 kDa), ovalbumina (51,8 kDa), anidrase carbonica (34,7 kDa) e lisozima (22,0 kDa). I gel sono colorati per proteine con Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce) e per attività con *p*-fenilendiammina allo 0,2% sciolta in tampone acetato 0.1 M pH 4.0 (Klonowska et al., 2002).

3.4 ANALISI FILOGENETICA

Le analisi filogenetiche sono state effettuate utilizzando il pacchetto software PHYLIP versione 3.66. Un insieme iniziale di sequenze fungine è stato ottenuto dal database di sequenze utilizzando quella della proteina Lcc2 come sonda. Il formato utilizzato da PHYLIP è stato prodotto con il programma ClustalX (Larkin et al., 2007). Le distanze filogenetiche sono state calcolate con il programma Protdist a partire dall'allineamento multiplo di sequenza. Queste distanze sono state utilizzate per costruire un albero filogenetico con il metodo Neighbor joining utilizzando il programma Drawgram.

3.5 PROVE DI DEGRADAZIONE

3.5.1 Immobilizzazione dell'enzima

L'immobilizzazione è stata effettuata per adsorbimento su Sepharose-ConA (Sigma-Aldrich), con una resa del 99,9% a pH 4.0. La resina Sepharose-Con A è stata lavata (2-3 volte) con tampone acetato 0.1 M, pH 4.0, successivamente è stata impaccata in una colonna cromatografica (1,0 x 10 cm) ed equilibrata con lo stesso tampone di partenza. L'enzima, diluito in 10 ml di tampone acetato 0.1 M, pH 4.0, è stato caricato sulla colonna cromatografica ad un flusso di 1 ml/min. Per calcolare la percentuale di enzima immobilizzato, è stato saggiato l'eluato della colonna sotto flusso di tampone acetato (1 ml/min) finché si è arrivati a non trovare più attività; le unità enzimatiche eluite corrispondono alla percentuale di enzima non immobilizzato. La procedura è estremamente rapida, e l'enzima immobilizzato è stabile e conserva il 100% dell'attività fino a 22 giorni, e ne conserva ancora l'80% dopo 1 mese.

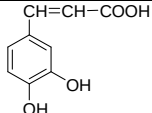
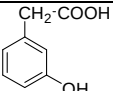
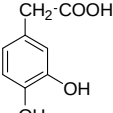
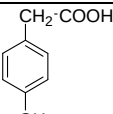
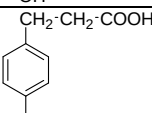
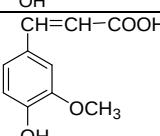
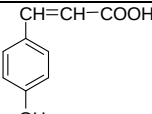
L'attività della laccasi è stata determinata seguendo con HPLC il consumo di un substrato ben metabolizzato dall'enzima, il guaiacolo (60 ml 10 mM), che è stato fatto passare in ricircolo continuo sulla colonna con l'enzima immobilizzato ad un flusso di 1 ml/min, nell'arco di 24 ore.

3.5.2 Prove di degradazione di composti fenolici

Le prime prove di degradazione sono state effettuate utilizzando un sistema in ricircolo su una miscela di sette fenoli di 100 ml. I fenoli utilizzati (mostrati nella tabella 3.9, Sigma-Aldrich) a una concentrazione di 0,4 mg/ml totali sciolti in tampone acetato 0,1 M, pH 4.0, sono stati caricati in continuo su colonna contenente *Sepharose-conA* e la laccasi Lcc1 immobilizzata per adsorbimento (1x6 cm, ca. 5 ml, con 50 U DMP immobilizzate) ad un flusso di 1 ml/min.

Le prove di degradazione sono state effettuate anche utilizzando un sistema in batch (in Falcon contenente 0,5 ml di Sepharose Con-A con 5 U DMP immobilizzate), in cui l'enzima immobilizzato è posto a contatto della soluzione contenente i substrati da degradare e in continua agitazione, utilizzando sempre le stesse condizioni di pH e concentrazione dei substrati. Queste prove sono state effettuate sia per i fenoli singoli che in miscela di tre fenoli acido caffeico, p-cumarico e acido 4-idrossifenilacetico (0,4 g/L di ciascuno fenolo).

Tabella 3.9 – Fenoli utilizzati nelle prove di degradazione

	Acido caffeico: acido diidrossicinnamico PM. 180,6
	Acido 3-idrossifenilacetico PM. 152,15
	Acido 3,4-didrossifenilacetico PM. 168,15
	Acido 4-idrossifenilacetico PM. 152,15
	Acido 3-(4-idossifenil)-propionico PM. 166,18
	Acido ferulico: acido 4-idrossi-3-metossi cinnamico PM. 194,19
	Acido p-cumarico PM: 164,16

3.5.3 Prove di degradazione di coloranti con enzima immobilizzato

Il sistema in batch è stato applicato anche alla degradazione di tre coloranti utilizzati in molti processi industriali: alizarina, amaranto e indaco (Sigma-Aldrich). I tre coloranti sono stati utilizzati separatamente a una concentrazione di 0,4 mg/ml in tampone acetato 0,1 M pH 4.0. E' stata effettuata una prima prova di decolorazione in assenza di mediatori, e successivamente la capacità catalitica dell'enzima è stata provata sia in presenza di HBT che di acido violurico (entrambi a concentrazione 1 mM). Sono state poi fatte delle prove su amaranto e alizarina in miscela, con 0,2 e 0,4 mg/ml di ciascun colorante. La degradazione dei substrati è stata analizzata mediante HPLC.

3.5.4 Analisi con HPLC

A vari intervalli di tempo (0, 4, 24, 28, 48, 52 e 72 ore) è stata prelevata un'aliquota di eluato ed è stata analizzata mediante HPLC per controllare il consumo del substrato.

Le cromatografie in HPLC sono state effettuate su una colonna YMC-Pack ODS-AM (25 cm x 0.46 cm) impiegando due solventi: una soluzione di acido acetico 2% in acqua milliQ (soluzione A) e una soluzione di acido acetico 2% e metanolo 30% in acqua milliQ (soluzione B), per un tempo di circa 60 minuti ad un flusso iniziale pari a 0,8 ml/min e una percentuale iniziale della soluzione B pari al 20%, monitorando l'eluato a 280 nm (il gradiente utilizzato è mostrato in Fig. 3.3).

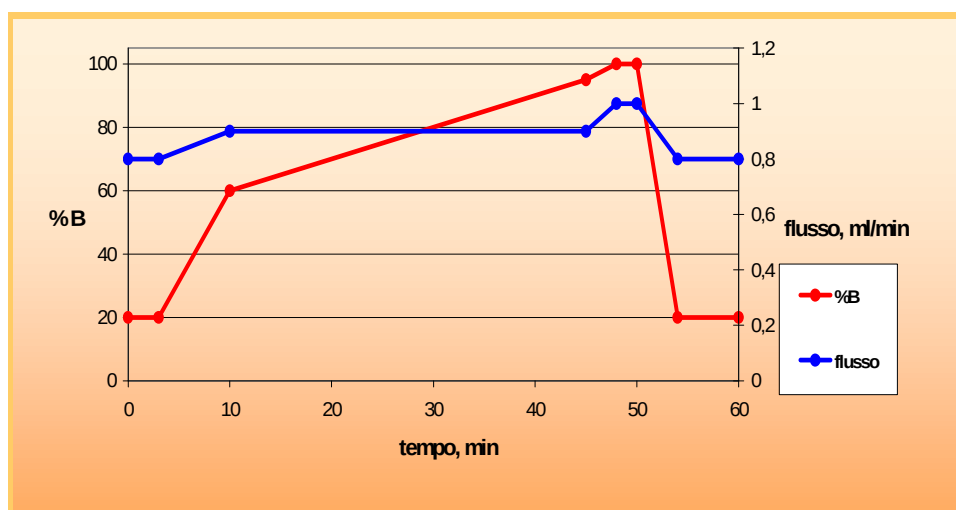


Figura 3.3 - Gradiente di eluizione HPLC utilizzato.

3.5.5 Prove di decolorazione in “Microtiter Plate”

Al fine di analizzare un più ampio campione di coloranti è stato utilizzato un sistema di screening rapido su Microtiter Plate che permette di effettuare numerose prove contemporaneamente.

Una Microtiter Plate è una piastra con 96 pozzetti (8x12) ognuno dei quali può contenere una miscela diversa. E' buona norma, comunque, lavorare in triplicati dai quali è possibile calcolare il valore medio e la deviazione standard. Un apposito spettrofotometro (50 MPR Microplate Reader, Varian) misura l'assorbanza in ciascun pozzetto. In tutti gli esperimenti effettuati con questo sistema, le unità enzimatiche utilizzate sono sempre state riferite ad ABTS come substrato.

I saggi di decolorazione sono stati effettuati su coloranti contenenti gruppi cromofori diversi (Fig. 3.4), azoici (amaranth, carmoisine, new coccine, sunset yellow), antrachinonici (remazol brilliant blue R), triarilmetano (patent blue) e indigoidi (indigo) (Sigma-Aldrich). Sono stati impiegati complessivamente sette coloranti, che in alcuni casi sono stati divisi in due gruppi (“serie rossa” e “serie blu”) in base al loro massimo di assorbimento, in modo da effettuare la scansione in un minor intervallo di lunghezze d’onda, riducendo quindi il tempo necessario ad effettuare la lettura dell’intera piastra.

I coloranti della “serie rossa” con massimo di assorbimento compreso tra 450-550 nm, appartengono tutti alla classe degli azoici, i coloranti della “serie blu” appartengono a classi diverse ma hanno un massimo di assorbimento sempre compreso tra 550 e 700 nm:

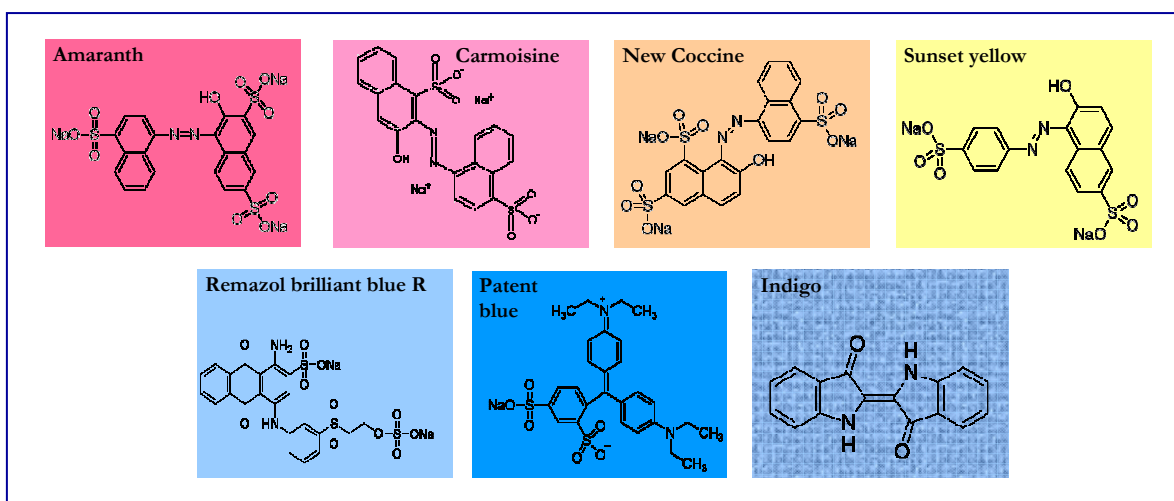


Figura 3.4 - Coloranti utilizzati nelle prove in microtiter

Su questi sette coloranti è stata effettuata una prova preliminare utilizzando 10 mU/ml dell’enzima Lcc1 wt e 0,05 mg/ml di colorante, ad eccezione del Remazol Brilliant Blue R (più concentrato: 0,25 mg/ml) e del Patent Blue (più diluito: 0,025 mg/ml), in tampone Sodio/Fosfato pH 5.0 per un volume totale di 250 μ l; sono stati condotti esperimenti con e senza mediatori (HBT o acido violurico, a concentrazione 1 mM).

Le prove successive, che hanno coinvolto solo i coloranti della serie rossa, sono state condotte con diverse concentrazioni di enzima (2,5 - 5 - 7,5 - 10 mU/ml), prima mantenendo il mediatore a concentrazione costante (1 mM) e poi variandolo proporzionalmente all’enzima (0,25 - 0,5 - 0,75 - 1 mM).

E’ stata poi misurata la degradazione del solo amaranto aumentando di molto la concentrazione dell’enzima (50 mU/ml, 100 mU/ml, 500 mU/ml, 1 U/ml) in assenza di mediatore. L’attività di Lcc1 wt è stata testata anche a diversi valori di pH (3.0 - 4.0 - 5.0).

Questo tipo di esperimenti è stato utilizzato anche per andare a confrontare l'enzima nativo con la forma ricombinante in *Pichia pastoris*. Sono state scelte le condizioni in cui la decolorazione non era completa ed era quindi possibile seguirne l'andamento nel tempo e rilevare eventuali differenze: 100 mU/ml di E senza mediatori; 10 mU/ml di E + 1 mM di HBT e 2,5 mU/ml di E + 1 mM AV.

L'analisi dell'efficienza di decolorazione è stata anche estesa all'enzima espresso in *S. cerevisiae* (Lcc1Sc) e *K. lactic* (Lcc1Kl).

3.6 OTTIMIZZAZIONE DELLA DECOLORAZIONE CON IL METODO RSM

La RSM (metodo delle superfici di risposta), descritta in primo luogo da Box e Wilson (1951), è un approccio sperimentale basato su tecniche matematiche e statistiche per analizzare gli effetti di diverse variabili indipendenti e identificare le condizioni ottimali in un sistema (Draper e John, 1988; Myers e Montgomery, 2002). Il disegno sperimentale permette di ottenere la massima quantità di informazioni dai dati raccolti effettuando il minor numero di prove sperimentali possibile. L'idea base è quella di variare tutti i fattori rilevanti simultaneamente in un certo numero di esperimenti e di collegare i risultati tramite un modello matematico. Questo modello può essere usato per interpretazione, previsioni e ottimizzazione.

MODDE 5 è un software abbastanza semplice da usare che ci permette di generare le superfici di risposta (RSM). Individuate le variabili per ognuna di esse bisogna scegliere un range di applicazione. Quindi è opportuno scegliere il tipo di disegno (con associato il tipo di modello matematico utilizzato e il numero di prove minimo da effettuare); nel nostro caso il D-optimal. A questo punto il programma ci genera un worksheet con gli esperimenti da effettuare. Una volta effettuate le prove e inseriti i dati ottenuti si passa all'analisi statistica dei dati. Il programma *MODDE 5* usa il metodo di regressione multipla (spiega la variabile dipendente y in funzione di k variabili esplicite, con $k > 2$). La significatività statistica del modello è valutata tramite l'analisi della varianza (ANOVA). Una misura della bontà della regressione è l'indice R^2 che varia tra 0 e 1 ed esprime quanto della variabilità complessiva di y è spiegabile tramite x . R^2 è la percentuale della variazione della risposta spiegabile dal modello. Un altro indice importante è il Q^2 che invece rappresenta il potere predittivo del modello. Valori vicini a 1 per R^2 e Q^2 indicano un buon modello con un eccellente potere predittivo. Il *Summary of fit list* mostra anche i valori della deviazione standard della risposta (SDY) e la deviazione standard dei residui (RSD). L'analisi ANOVA fornisce inoltre il *lack of fit plot* che compara il *lack of fit* (errore modello) con l'errore puro.

L'Ottimizzazione ci permette di trovare le condizioni migliori per un desiderato profilo delle nostre risposte, aiutandoci a interpretare i risultati e a trovare una regione di operabilità.

Abbiamo utilizzando il programma MODDE 5 e il metodo RSM per ottimizzare 5 variabili, concentrazione di colorante (Amaranto: $0,02 \div 0,1$ mg/ml; Remazol brilliant blue R: $0,1 \div 0,5$ mg/ml), pH ($3,0 \div 6,0$), mediatore redox ($0,1 \div 1$ mM solo per amaranto), unità di enzima ($2,5 \div 10$ mU/ml), tempo ($0 \div 6$ ore).

3.7 Modeling di Lcc2

Dedotta la struttura primaria dalla sequenza genica di Lcc2, ne è stato costruito un modello 3-D sulla base delle coordinate tridimensionali della laccasi omologa di *T.trogii*, Lcc1 (Matera et al., 2008; PDB code 2hrq)

Il programma Swiss Model è stato usato per sviluppare il modello della proteina secondo la metodologia comparativa (Guex e Peitsch, 1997). La struttura secondaria è stata assegnata dal programma DSSP (Kabsch e Sander, 1983). La qualità stereochimica è stata valutata dal programma PROCHECK (Laskowski et al., 1993). Le figure sono state disegnate con i programmi Swiss PDB Viewer (Guex e Peitsch, 1997) e Pymol (Delano scientific, <http://pymol.sourceforge.net>), le coordinate della struttura 3-D dell'ABTS sono state scaricate dal Protein Data Bank come file ".pdb". Il docking dell' ABTS è stato realizzato usando il programma Molegro Virtual Docker (<http://www.molegro.com>).

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 PRODUZIONE DI LACCASI NATIVE E MODIFICATE

4.1.1 PURIFICAZIONE DELLE ISOFORME LACCASICHE DI *TRAMETES TROGII*

Trametes trogii 201 è un basidiomicete *white-rot* in grado di degradare in modo efficiente i componenti del materiale ligninocellulosico e, al contempo, è un buon produttore di laccasi (Alfani et al., 1990). Quando viene cresciuto in coltura sommersa su terreno sintetico addizionato con estratto di lievito, produce una laccasi principale, denominata Lcc1, che è stata purificata e caratterizzata (Garzillo et al., 1998). Inoltre il fungo secerne nel brodo colturale in basse quantità, almeno altre cinque laccasi la cui produzione può essere fortemente influenzata dalle condizioni culturali. La presenza di molte isoforme di laccasi è un fenomeno osservato frequentemente nei funghi ligninolitici sebbene la sua importanza fisiologica non sia ancora chiarita.

Allo scopo di individuare isoenzimi con caratteristiche chimico-fisiche e cinetiche particolarmente interessanti dal punto di vista applicativo, si è cercato di purificare e caratterizzare alcune isoforme dal brodo di coltura di *T. trogii*.

Il brodo di coltura concentrato è stato sottoposto a cromatografia di scambio ionico su resina Q-Sepharose Fast Flow, connessa ad un sistema FPLC (Pharmacia), utilizzando un gradiente di forza ionica, secondo il programma descritto nel paragrafo 3.3.1.2.

Il profilo di eluizione mostra netta prevalenza della forma maggioritaria Lcc1 (Fig. 4.1a) eluita ad una concentrazione di NaCl 0,16M. Le altre laccasi prodotte da *T. trogii* sono visibili solo quando la scala viene amplificata (Fig. 4.1b), mostrando altri cinque picchi, corrispondenti a cinque isoforme minoritari, raccolte separatamente e denominate convenzionalmente P2, P3, P4, P5, P6 secondo l'ordine di eluizione. Le isoforme minoritarie rappresentano complessivamente circa il 10% dell'attività totale (Tab. 4.1).

Tabella 4.1 – Attività percentuale di ogni isoforma rispetto al totale.

Isoforma	% isoforma rispetto all'attività totale
Lcc1	90,5
P2	4,00
P3	1,48
P4	1,07
P5	1,70
P6	1,25

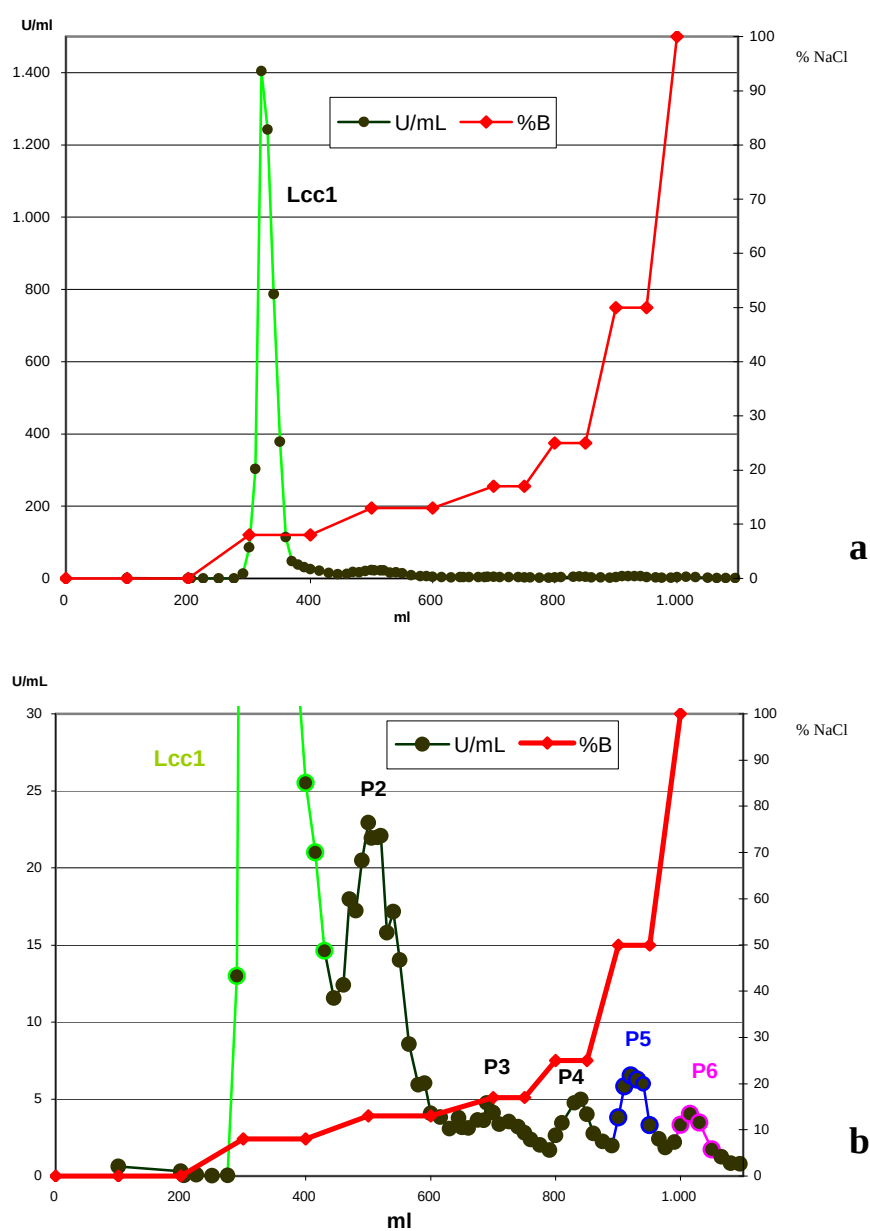


Figura 4.1 – Cromatografia a scambio ionico su Q-Sepharose Fast Flow (a) e su scala amplificata (b).

Abbiamo poi ulteriormente purificato e caratterizzato l'isoforma maggioritaria Lcc1 e le minoritarie P5 e P6, che rappresentano complessivamente meno del 4% dell'attività totale, mediante cromatografia di interazione idrofobica su resina Phenyl-Sepharose in gradiente decrescente di ammonio solfato, secondo il programma descritto nel paragrafo 3.3.1.3.

Le isoforme P5 e P6, oltre ad avere un diverso punto isoelettrico rispetto a Lcc1, differiscono da questa per il contenuto di residui idrofobici, come testimoniano i diversi tempi di eluizione nella cromatografia di interazione idrofobica (Fig. 4.2).

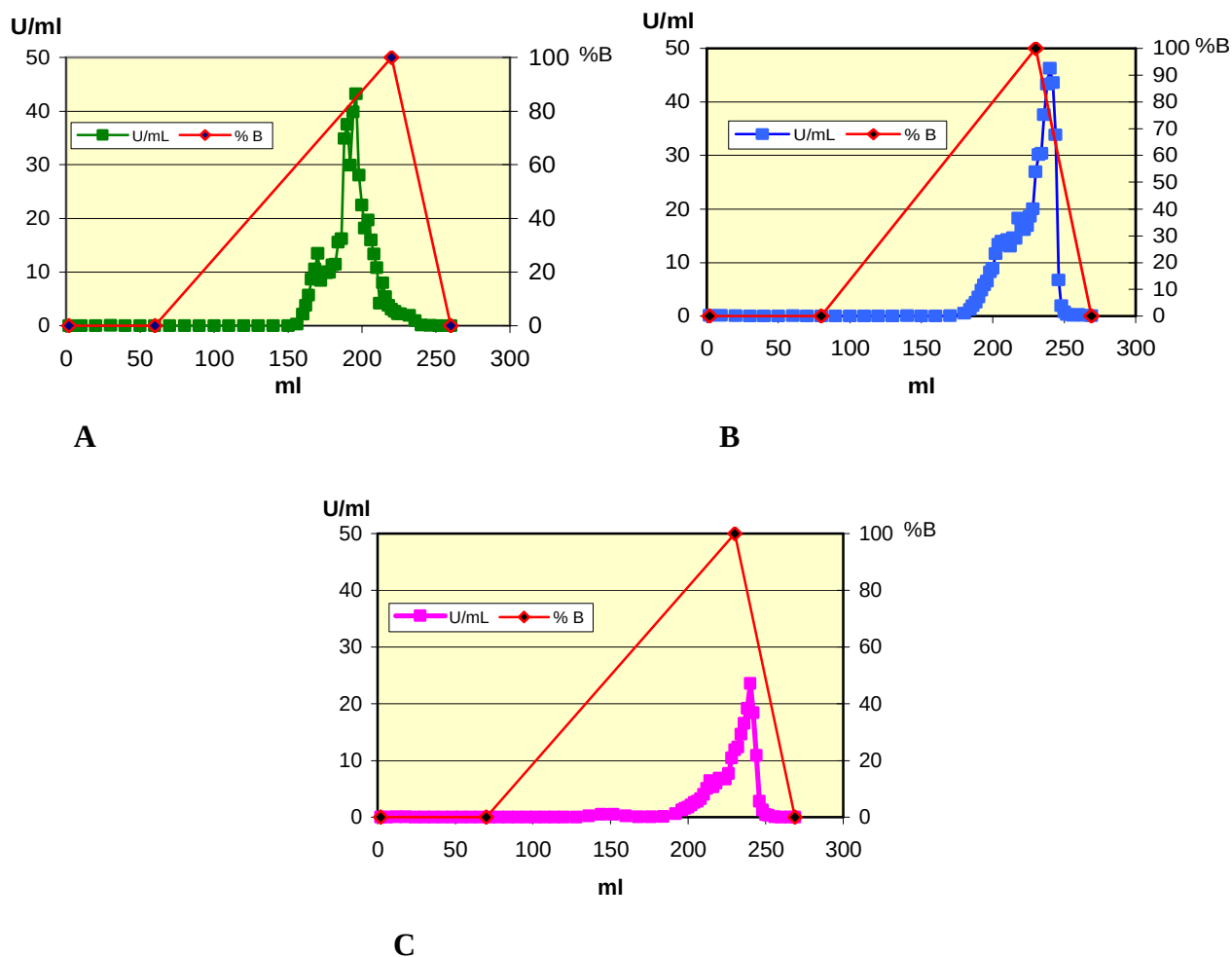


Figura 4.2 - Cromatografie a interazione idrofobia su Phenyl-Sepharose di Lcc1 (A), P5 (B), P6 (C)

4.1.1.1 Caratterizzazione delle isoforme

Allo scopo di indagare se le isoforme secondarie presentino caratteristiche chimico-fisiche diverse dall'isoforma principale e interessanti per scopi applicativi, abbiamo analizzato la dipendenza dell'attività dal pH dei 3 isoenzimi con diversi substrati, sia di tipo fenolico (DMP e guaiacolo), che non fenolico (ABTS).

Per quanto riguarda l'attività verso il substrato non fenolico, ABTS, le 3 curve di attività/pH non presentano differenze rilevanti; la massima attività si riscontra a pH molto acidi, compresi tra 3.0 e 3.5 (Fig. 4.3A).

Con il 2,6-dimetossifenolo sono emerse le prime significative differenze tra le 3 isoforme. L'attività di Lcc1 ha un profilo a campana: con il massimo a pH 3.5; P5 nell'intervallo di pH compreso tra 3.0 e 7.5 ha un andamento sostanzialmente sovrapponibile a Lcc1. L'attività di P6 mostra un profilo a campana più spostato verso i pH neutri: l'optimum è di 4.0 e si mantiene più attiva rispetto a Lcc1 e P5 tra pH 4.0 e 5.5 (Fig. 4.3B).

Un comportamento analogo si ha per l'attività verso il guaiacolo, l'altro substrato fenolico; P5 e Lcc1 hanno curve a campana quasi identiche, con pH ottimale 4.0, mentre l'isoenzima P6 ha un'attività massima nell'intervallo di pH 4.0-5.0 per poi diminuire più lentamente delle altre 2 isoforme all'aumentare del pH (Fig. 4.3C).

L'isoenzima P6 si dimostra quindi interessante per applicazioni in campi in cui siano necessarie condizioni di reazione non particolarmente acide.

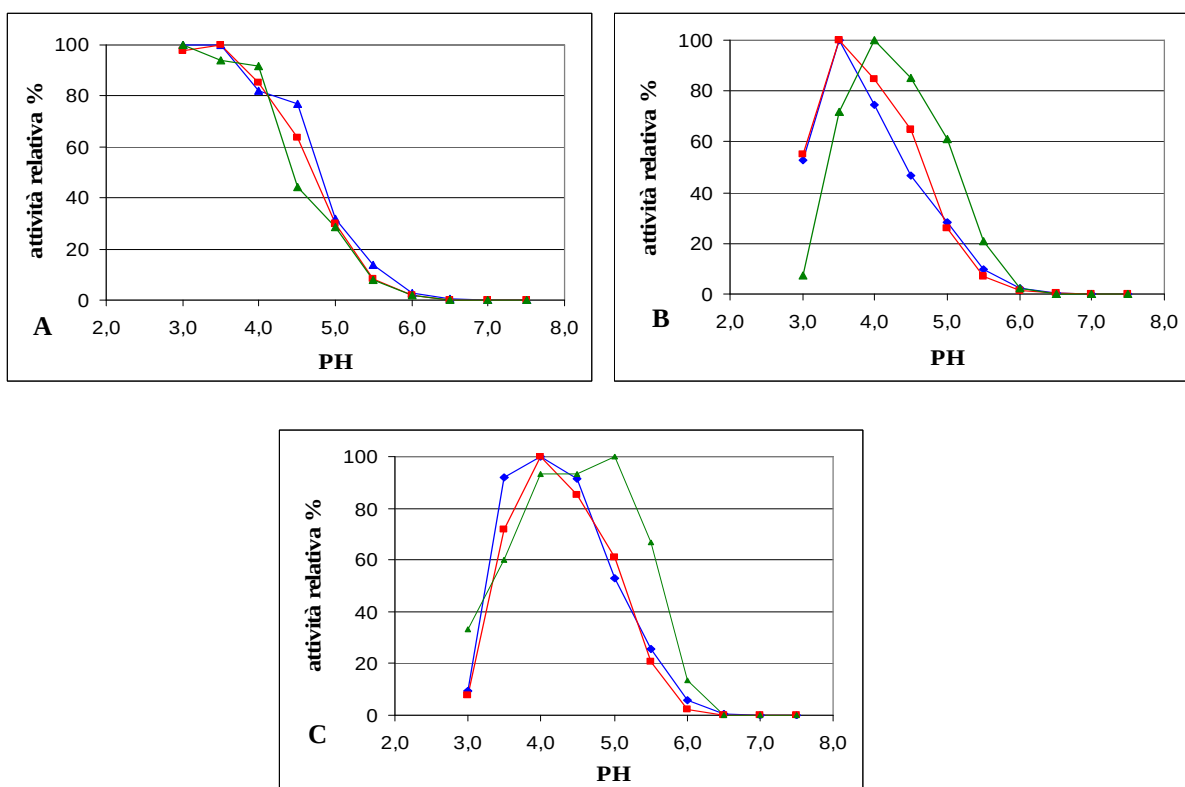


Figura 4.3 - Profilo attività/pH con i substrati ABTS (A), DMP (B) e guaiacolo (C) di Lcc1 (triangolo blu), P5 (quadrato rosso) e P6 (rombo verde).

4.1.2 ISOLAMENTO E CLONAGGIO DEL GENE *lcc2* E CARATTERIZZAZIONE DEL SUO PRODOTTO

4.1.2.1 Isolamento e Clonaggio del gene *lcc2* di *Trametes trogii* 201

Come si è visto, almeno una delle isoforme minoritarie prodotte da *T. trogii* ha caratteristiche che potrebbero presentare vantaggi in applicazioni ambientali. Purtroppo però la loro purificazione e descrizione richiede tempo poiché rappresentano complessivamente meno di 10% dell'attività laccasica totale. Abbiamo quindi provato ad isolare altri geni e ad esprimerli nell'ospite eterologo *Pichia pastoris*, un lievito metilotrofico già usato per esprimere un certo numero di laccasi fungine (Soden et al., 2002; Liu et al., 2003; Colao et al., 2006).

I geni codificanti le laccasi sono stati amplificati dal cDNA di *T. trogii* per mezzo di primer degenerati progettati sulle regioni delle sequenze amminoacidiche conservate che sono coinvolte nel legame degli ioni rame di tipo 1 e di tipo 2 nelle laccasi dei basidiomiceti. Un prodotto di PCR di circa 1000 bp è stato amplificato dal cDNA ottenuto dal micelio, cresciuto su estratto di malto liquido addizionato con rame, e successivamente clonato; 60 cloni sono stati sottoposti all'analisi di restrizione, i frammenti di 4 isozimi di laccasi sono stati identificati ed è stato assegnato loro il nome *lcc1*, *lcc2*, *lcc3* e *lcc4*; uno di loro, *lcc1*, corrisponde al gene precedentemente isolato da *T. trogii* codificante la laccasi principale Lcc1 (Colao et al., 2003). Per mezzo di un protocollo RACE, un secondo gene, *lcc2*, è stato clonato e sequenziato. Un frammento di 1855 bp di cDNA è stato analizzato e la sequenza ottenuta conteneva una open reading frame (ORF) di 1587 bp, corrispondente ad una proteina precursore di 528 residui amminoacidici con una sequenza leader di 22 residui (Fig.4.4).

Dalla sequenza tradotta del DNA, è stato calcolato, per la proteina Lcc2 ricombinante, un peso molecolare di 56.800 Da. La sequenza caratteristica della laccasi, contenente una cisteina e dieci residui d'istidina coinvolti nel legame di quattro ioni di rame, conservate in Lcc2 e sono presenti 6 potenziali siti di N-glicosilazione. Lcc1 e Lcc2 presentano un'identità di sequenza del 69% e una similarità dell'87%. Se confrontato con Lcc1, Lcc2 possiede 11 residui amminoacidici supplementari, 6 dei quali costituiscono l'estremità carbossi-terminale. Poiché le isoforme secondarie delle laccasi di *T. trogii* non sono ancora state tutte caratterizzate, non possiamo al momento stabilire un collegamento sequenza-enzima fra il prodotto di *lcc2* ed una delle laccasi native del fungo.

1 **ATG**AGCAAGTTCCAGTCCCTCGCTGCCTTCATCGCTCTCAGCCTTTCCACGGCCGCTTA
 1 **M S K F Q S L A A F I A L S L S T G R L**

 61 GCCGCCGCCGCATCGGTCCCACCGCCGACTTGACCATTTGAAACGCTGACATTTCTCCC
 21 **A A A** A I G P T A D L T I S N A D I S P
 ↑ *sito di taglio del peptide segnale*

 121 GATGGCTTCACTCGTGGGCTGTTGTGCGAACAACAGTTCCTGGTCCCCTCATCACT
 41 D G F T R A A V V A N N Q F P G P L I T

 181 GGTAACAAG**gt**tagttttcttaccgcgactctccgtatgctacggctcacattcatgtta
 61 G N K *introne I*

 241 ctctt**ag**GGTGACACCTTCCAACCTCAACGTTATCGATAACTTGACCAACGATACCATGTT
 64 G D T F Q L N V I D **N L T N D T** M L
N-glicosilazione

 301 GACTGCAACTACCATT**gt**aagcttacgacatgctttcagtttatttgatcgaacccta
 82 T A T T I *introne II*

 361 agacatccatggc**ag**CATTGGCACGGCTTCTTCCAGAAGGGTACGAATTGGGCAGATGGA
 87 **H W H** G F F Q K G T N W A D G
 2 3

 421 CCCGCGTTTGTCAACCAAGTGCCTATCTCGGAGGGCAACTCCTTCCTTTACGACTTCGCT
 102 P A F V N Q C P I S E G N S F L Y D F A

 481 GCTCCGGGCCAAGCTGGCACGTTCTGGTACCACAGTCATCTTCCACGAATACTGCGAC
 122 A P G Q A G T F W Y **H S H** L S T Q Y C D
 3 3

 541 GGTCTTCGTGGCGTGATGGTGTGACGACCCCAATGACCCGCACAAGTCCTTGTACGAT
 142 G L R G V M V V Y D P N D P H K S L Y D

 601 GTCGATGACG**gt**aagcgggcgcgtgtacctaccatacacttggcagcacttaccactcat
 162 V D D *introne III*

 661 ctctc**ag**AGTCAACCGTCATCACTCTGGCAGATTGGTACCACACTGCTGCCCGTCTCGG
 165 E S T V I T L A D W Y H T A A R L G

 721 TCCTCGCTTCCCGTTCCGGCGCCGACACTGTCCTCATCAATGGCCTGGGGCGGTTTCGCTAC
 183 P R F P F G A D T V L I N G L G R F A T

 781 TGGGGATCCCGACGCTGAGATCGCCGTGATCACCGTCACGAAGGGCAAGCGTTACCGCTT
 203 G D P D A E I A V I T V T K G K R Y R F

 841 CCGCCTTGCGAACATCTCTTGCGACCCCAACTTCACCTTCTCCATCCAAGGTCACACCAT
 223 R L A **N I S** C D P **N F T** F S I Q G H T M
N-glicosilazione

 901 GAACGTTATCGAAGTCGATTCCGTCAACGTGACACCTTACGAGGTCGACGCCATCCAGAC
 243 N V I E V D S V N V T P Y E V D A I Q T

 961 GTTTGCTGGCCAGCGGTACTCCTTCGTT**gt**acgtcatgcttgtgcctttcactactccga
 263 F A G Q R Y S F V *introne IV*

 1021 aacctctcacatgatctgtttac**ag**CTCACCGTCGACAGGACATTGACAACTACTGGAT
 272 L T V D Q D I D N Y W M

 1081 GTGGGCTATTCCCAACATCGGTACCATTAACACCGACGGTGGTGTCAACTCTGCCATCCT
 284 W A I P N I G T I N T D G G V N S A I L

 1141 CCGTTACGACGGCGCAGCTGAGGTGCGAGCCCGACGCCGCGAGCCCGAGTCCAGCAACCA
 304 R Y D G A A E V E P D A A S P S P S N Q

 1201 GCTCGTTGAGAGGAACATTGTCCCCCTTACCGACCTCGCCGCGCCTGGCAACCCGACCGT
 324 L V E R N I V P L T D L A A P G N P T V

1261 CGGTGGCGTTGACTATGCCTTGAACCTCGACTTCAGCTTCgtgagtcttccatgcagttg
 344 G G V D Y A L N L D F S F introne V
 1321 tccgtgattggtcagcaacttatcattgatgcagGACGGGGCCAACTTCGCCATCAACGG
 357 D G A N F A I N G
 1381 CGAGTCGTACACGTCGCCCTCCGTCCCGGTCCTCTTGAGATCCTGAGCGGTGCCAGAC
 366 E S Y T S P S V P V L L Q I L S G A Q T
 1441 TGCACCGGACCTCTCCCCGGTGGTAGCGGTACGTCTGCCGTCCAACGCGACCATCGA
 386 A P D L L P G G S V Y V L P S N A T I E
 N-glicosilazione
 1501 GCTCTCGTTCCCGATGACCGCAAGCAACGCACCGGGTGGGCCCCACCCCTTCCACTTGCA
 406 L S F P M T A S N A P G G P H P F H L H
 1 2 3
 1561 CGGAgtgaagcaccattcttacttgacccccgcgcatgctgactgtagctacgctcgcc
 426 G introne VI
 1621 ctctagCACACCTTCCACGTCGTCGGCTCCGCCGGCCAGACCGACTACAACCTACGTCAAC
 427 H T F H V V R S A G Q T D Y N Y V N
 1681 CCGCCCCAGCGTGACACCGTATCCGTCCGTGCGGCTGGCGACAACGTACCATCCGCTTC
 445 P P Q R D T V S V G A A G D N V T I R F
 N-glicosilazione
 1741 CGGACCGACAACCCTGGCCCGTGGTTCCTCCACTGCCACATCGACTTCCACCTCGAGGCC
 465 R T D N P G P W F L H C H I D F H L E A
 3 1 3 1
 1801 GGGTTCGCCGTGCTCTTCGCTGAGGACACCCCAACGTCGCTTCCGCGAACAAGCCAGT
 485 G F A V V F A E D T P N V A S A N K P S
 1
 1861 Ggtgcgactcttttctggcattcgttagtgagcgatgctgatcggtgggatttgattta
 introne VII
 1921 caagCTGCTTGGGAGGACCTCTGCCCGACGTACAACCTCCGTATACCCAACGGCGACAAC
 505 A A W E D L C P T Y N S V Y P N G D N
 1981 GGCGACGCGCGCCGGTGAacagtctgcccactgtgaataccgagggacaggccgcgagt
 525 G D A R R *
 1981 cgcacgctcgctccaactccctcatccagcaccgctgaaggctcactaaaccgaagagac
 2041 agtcgctagagagaggctcgtagtattttattcaccacctacttacactatacctactt
 2101 gggcatccggcacatacgttcgttctctgtttgggtcatacagtaagtcgtttaaactg
 2161 tcttgctttgcatcatcgctgaactttcccttttcgtgttgaagc

Figura 4.4 – Sequenza nucleotidica e sequenza aminoacidica dedotta dal gene *lcc2* del fungo *T. trogii*. In maiuscolo è indicata la sequenza codante, mentre in minuscolo le sequenze introniche; in blu sono evidenziate le estremità dei siti di splicing. I possibili siti di N-glicosilazione sono sottolineati in giallo, mentre in celeste sono indicati i residui di istidina che coordinano gli ioni rame (il numero indica il legame con rame di tipo, 1, 2 o 3). Il peptide segnale è indicato in rosso.

4.1.2.2 Espressione del gene *lcc2* in *P. pastoris*

Per caratterizzare Lcc2, il cDNA corrispondente al gene *lcc2* è stato espresso nel lievito metilotrofo *Pichia pastoris* GS115, sotto il controllo del promotore strettamente regolato dell'alcool ossidasi (PAOXI) indotto da metanolo, utilizzando sia il peptide segnale nativo che quello dell' α -factor di *Saccharomyces cerevisiae* per dirigere la secrezione della proteina ricombinante, con la stessa metodologia descritta in dettaglio più avanti per i mutanti.

L'attività enzimatica è stata rilevata su terreno salino contenente metanolo, come fonte di carbonio ed induttore, e ABTS, come substrato cromogenico delle laccasi: un alone verde che circonda le colonie rivelando la produzione di enzima ricombinante attivo secreto nel mezzo, era presente solo quando è stato impiegato il peptide segnale dell' α -factor. I trasformanti che producono una maggior attività nel test in piastra sono stati utilizzati per la produzione di Lcc2 ricombinante in condizioni di coltura controllate in un fermentatore da 2 l, utilizzando la metodologia già ottimizzata. Dopo 6 giorni di crescita, sono state ottenute 340 U/l, per un peso secco delle cellule di 123 g/l con una produttività specifica di 2.7 U/g di biomassa; la concentrazione di proteina solubile totale dopo sei giorni è stata di 286 mg/l. Il brodo colturale ottenuto al termine del processo fermentativo è stato concentrato, dializzato e parzialmente purificato per cromatografia di scambio ionico nelle stesse condizioni utilizzate per Lcc1, P5, P6 e i mutanti e descritte nel paragrafo 3.3.1.2. Al termine di questo passaggio l'attività specifica della proteina ricombinante è arrivata a circa 5 U/mg. Un'elettroforesi su gel di poliacrilammide ha mostrato che l'enzima ricombinante ha un peso molecolare di circa 70000, un valore superiore rispetto al previsto probabilmente dovuto alla iperglicosilazione da parte di *P. pastoris*.

4.1.2.3 Analisi filogenetica

Una ricerca in banca dati ha indicato che la proteina prodotta dal gene *lcc2* mostra un alto grado di somiglianza con le sequenze amminoacidiche di altre laccasi prodotte da basidiomiceti finora caratterizzate: Lac2 di *Trametes C30* (identità del 94%, similarità del 99%), Lac2 di *Polyporus brumalis* (identità dell'82%, similarità del 94%), Lcc3-2 di *Polyporus ciliatus* (identità dell'81%, similarità del 93%), Lac3 di *Trametes C30* (identità del 75%, similarità del 91%). Le somiglianze fra le sequenze sono state analizzate usando il metodo del neighbour joining per derivare un albero filogenetico (Fig. 4.5).

L'analisi filogenetica ha indicato che Lcc2 di *T. trogii* raggruppa insieme a Lac2 di *Trametes C30*, mentre Lcc1, l'isoforma principale di *T. trogii*, forma un ramo indipendente. I due geni delle laccasi di *T. trogii* sono apparentemente paraloghi e, come suggerito per altre

laccasi (Makela et al., 2006), potrebbero essersi evolute da eventi di duplicazione e divergenza.

Secondo un'analisi dettagliata delle laccasi prodotte da basidiomiceti, Hoegger et al. (2006) hanno suggerito che il raggruppamento delle sequenze possa riflettere almeno parzialmente la funzione dei rispettivi enzimi. Le laccasi Lcc1 e Lcc2 di *T. trogii* raggruppano insieme ad altri enzimi della decomposizione del legno ma sono separati sull'albero filogenetico suggerendo differenti ruoli per questi due enzimi. Infatti, le due isoforme prodotte da *T. trogii*, mostrano proprietà biochimiche differenti e la ricombinante ha un comportamento interessante nei confronti dei substrati aromatici, mostrando un pH ottimale più vicino alla neutralità rispetto a Lcc1.

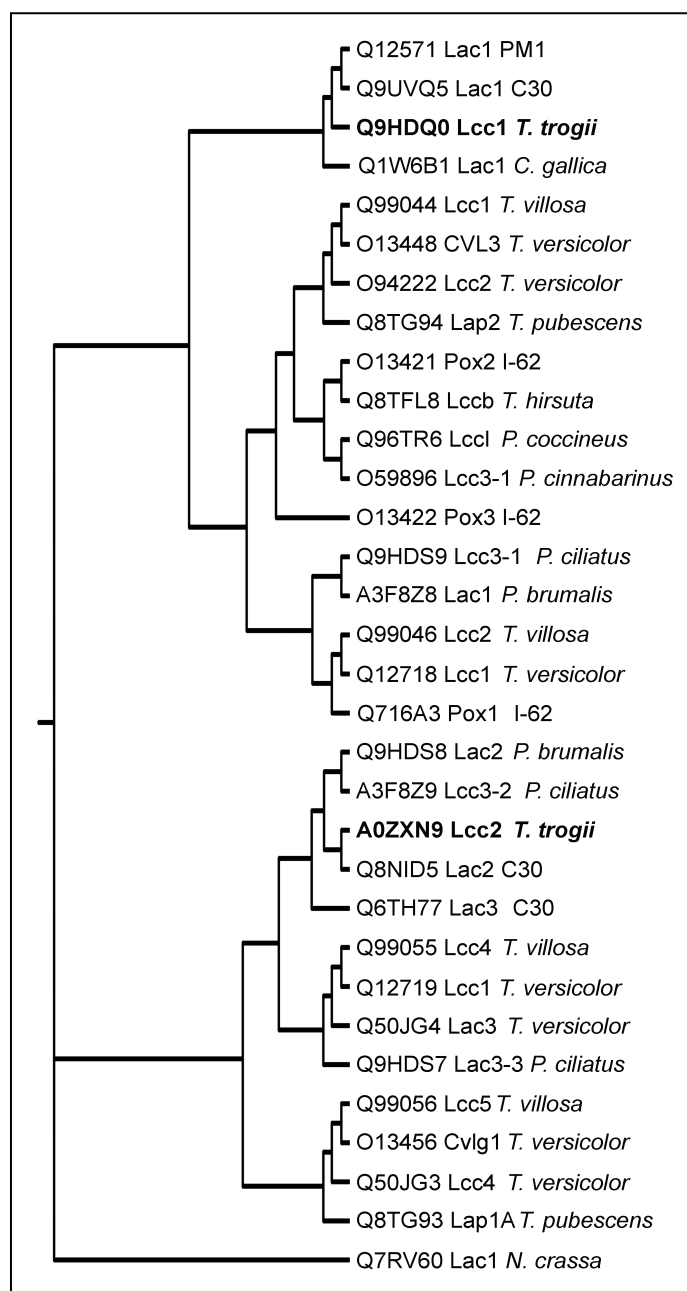


Figura 4.5 - Albero filogenetico delle laccasi Lcc1 e Lcc2 in comparazione con quelle prodotte da altri basidiomiceti, determinato con il metodo del Neighbour joining.

4.1.2.4 Proprietà fisico-chimiche e parametri cinetici

I parametri cinetici di Lcc2 ricombinante verso i tre substrati più comuni delle laccasi (ABTS, DMP e guaiacolo) sono indicati in tabella 4.2, in confronto a quelli della Lcc1 ricombinante di *T.trogii*, precedentemente caratterizzata (Colao et al., 2006). Lcc2 mostra un comportamento catalitico significativamente differente da quello di Lcc1; in particolare, Lcc2 mostra un più basso rendimento (k_{cat}/K_M) di Lcc1 nell'ossidazione di ABTS, dovuto principalmente al valore di circa 20 volte più alto di K_M , mentre l'efficienza verso i substrati fenolici è dello stesso ordine di grandezza di quella di Lcc1, poiché un aumento nell'affinità per i substrati (diminuzione di K_M) compensa la diminuzione generale nella cinetica del trasferimento degli elettroni (diminuzione di k_{cat}) di Lcc2.

Tabella 4.2 - Costanti cinetiche delle laccasi ricombinanti, Lcc2 e Lcc1.

Substrato	Lcc2 Ricombinante			Lcc1 Ricombinante		
	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu M^{-1}min^{-1}$)	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu M^{-1}min^{-1}$)
ABTS	218 $\pm$ 11	347 $\pm$ 7	1.6	9 $\pm$ 1	5899 $\pm$	641
DMP	117 $\pm$ 22	107 $\pm$ 6	0.9	529 $\pm$ 27	3339 $\pm$ 55	6
Guaiacolo	961 $\pm$ 38	30 $\pm$ 1	3.10 ⁻²	4177 $\pm$ 70	305 $\pm$ 3	7.10 ⁻²

L'effetto del pH sull'attività di Lcc2 utilizzando substrati non fenolici come l'ABTS e fenolici, come 2,6-dimetossifenolo e guaiacolo, in paragone a Lcc1 è mostrato in Fig. 4.6.

Il profilo attività/pH dipende fortemente dalla natura chimica del substrato considerato. Infatti con l'ABTS non vi è un massimo di attività vero e proprio nell'intervallo di pH analizzato, la curva presenta infatti un profilo monotonicamente decrescente simile a quello osservato per altre laccasi fungine tra cui Lcc1. Con i substrati fenolici DMP e guaiacolo si osserva una tipica curva a campana, con un pH ottimale di 5.0, un valore spostato di 1 e 2 unità, rispettivamente, verso la neutralità rispetto a Lcc1. È interessante notare che l'intero profilo attività/pH di Lcc2 con i substrati fenolici sembra spostato verso i valori meno acidi, di modo che l'enzima conserva circa 40% della sua attività a pH 6.0 e questo rende l'enzima particolarmente interessante dal punto di vista applicativo. All'optimum di pH, Lcc2 mostra una più alta affinità verso i substrati fenolici (come indicano i valori più bassi di K_M), rispetto a Lcc1.

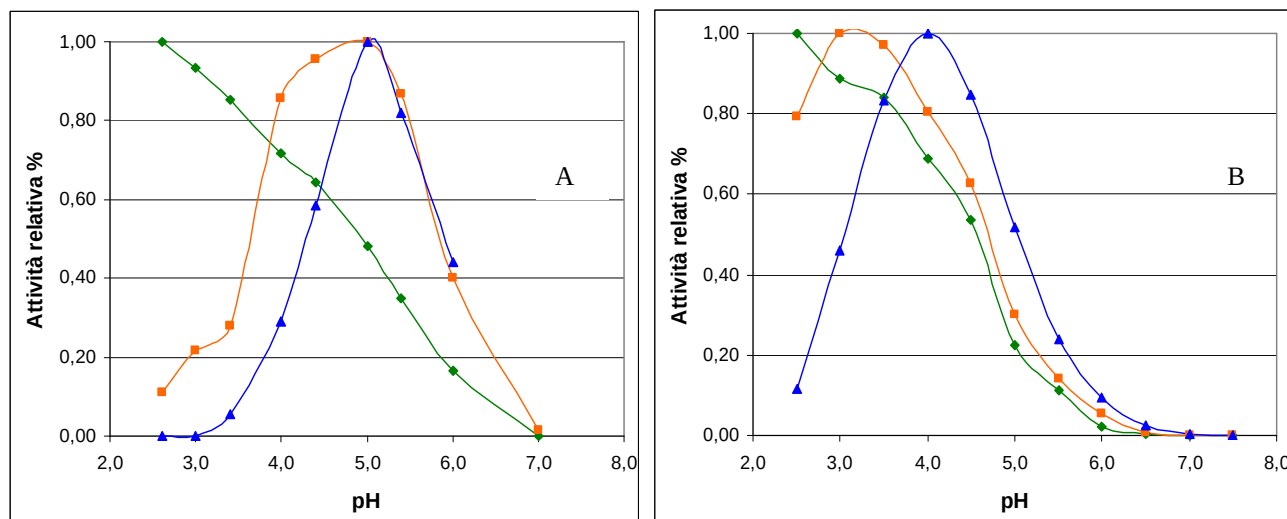


Fig. 4.6 - Profilo attività/pH di Lcc2 (A) e Lcc1 (B) con i substrati ABTS (rombo verde), DMP (quadrato arancione) e guaiacolo (triangolo blu).

E' ampiamente accettato (Koudelka e Ettinger, 1988) che anioni quali idrossile e alogenuri legano il centro trinucleare T2T3 ed inibiscono l'attività della laccasi. È stato quindi analizzato l'effetto degli alogenuri sull'attività delle due laccasi ricombinanti Lcc2 e Lcc1 con il 2,6-dimetossifenolo come substrato.

Per valutare l'effetto inibitorio è stato usato come parametro I_{50} , cioè la concentrazione di alogenuro che determina una diminuzione dell'attività laccasica pari al 50%. Questo valore è estrapolato da grafici in cui l'attività enzimatica è riportata in funzione della concentrazione degli alogenuri (Fig. 4.7 e Tabella 4.3).

L'effetto inibitorio degli alogenuri è stato ben caratterizzato nel passato per ossidasi contenenti rame: laccasi, ceruloplasmina e tirosina (Yaropolov et al., 1994). In generale, la potenza di inibizione degli ioni fluoruro, cloruro e bromuro è inversamente proporzionale al loro raggio, probabilmente perché l'ingombro sterico costituisce una limitazione all'accesso dell'alogenuro al sito di legame (Xu et al., 1997; Johannes et al., 2000b). Infatti, come previsto, l'ordine di inibizione osservato per entrambe le proteine è $F^- > Cl^- > Br^-$; tuttavia gli alogenuri più ingombranti Br^- e Cl^- hanno inibito più efficientemente Lcc2 che Lcc1.

L'aumento significativo di inibizione, da parte degli alogenuri ingombranti quali cloruro e bromuro, dell'attività di Lcc2 rispetto a Lcc1, potrebbe essere attribuita all'alterazione strutturale del canale che collega il sito trinucleare al solvente ed è coinvolto nell'ingresso dell'ossigeno e nel rilascio del prodotto.

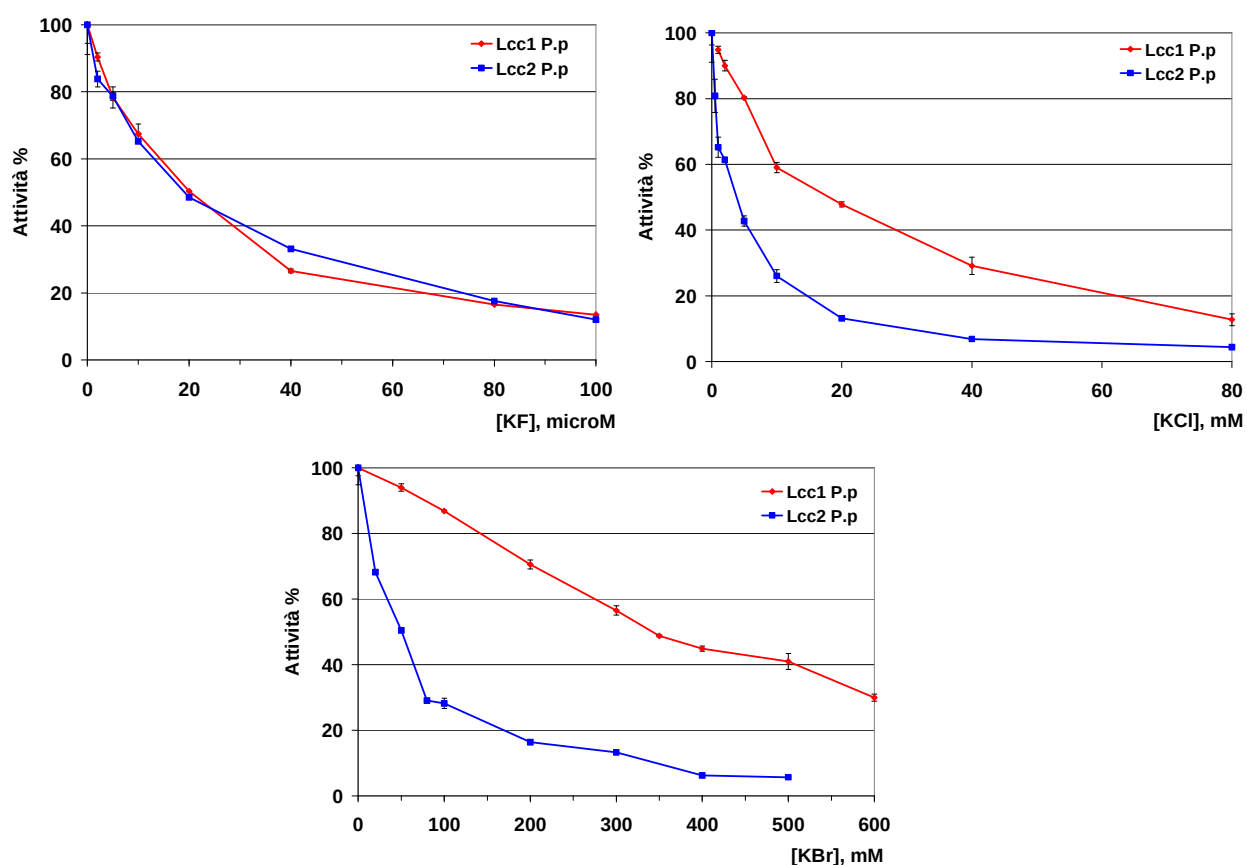


Figura 4.7 - Attività enzimatica in funzione della concentrazione degli alogenuri sul substrato DMP.

Tabella 4.3 - Inibizione delle laccasi ricombinanti da parte degli alogenuri in presenza del substrato DMP (I_{50} è la concentrazione di alogenuro che causa un'inibizione del 50%).

Halide	I_{50} (mM)	
	Lcc2	Lcc1
F-	0.020	0.019
Cl-	4	18
Br-	50	340

4.1.2.5 Struttura tridimensionale di Lcc2

La struttura tridimensionale della laccasi Lcc1 di *T. trogii* (Matera et al., 2008) è stata usata come template per la costruzione del modello di Lcc2 tramite modeling comparativo. Il migliore allineamento delle sequenze delle due proteine (identità del 69.2%) è stato usato per realizzare il modello tridimensionale.

La struttura tridimensionale di Lcc2 è molto simile a quella di Lcc1, compresi gli elementi della struttura secondaria che consistono in barili β antiparalleli; le differenze sono principalmente nei loops in cui sono presenti inserzioni o delezioni di residui amminoacidici (Fig. 4.8). Similmente a Lcc1 ed alla maggior parte delle laccasi fungine monomeriche (Piontek et al., 2002; Hakulinen et al., 2002; Matera et al., 2008), l'architettura molecolare di Lcc2 consiste in una struttura globulare formata da tre domini organizzati in sequenza che potrebbero essere identificati approssimativamente con le sequenze degli amminoacidi 1-156 (dominio A), 157-340 (dominio B) e 341-506 (dominio C). Lcc1 ha due catene di carboidrati sull'Asn 54 e sull'Asn 433; entrambe le sequenze consenso Asn-XXX-Thr (54-56 e 435-437, rispettivamente) sono conservate in Lcc2 e possiamo supporre che questa proteina sia glicosilata in queste posizioni. Le catene di carboidrati determinano, verosimilmente, la differenza che è stata osservata fra la massa molecolare calcolata (56808 Da) ed il valore valutato dall'SDS-PAGE (circa 70000 Da). In accordo con la struttura di riferimento Lcc1, è immaginabile che anche Lcc2 sia stabilizzata da due ponti di disolfuro che collegano i domini A e B (Cys 117-Cys 205) ed A e C (Cys 85-Cys 487) rispettivamente.

L'architettura di base dei siti rame e del sito del substrato di Lcc2 è molto simile a quella di Lcc1 (Fig. 4.9) ed i residui che coordinano i quattro ioni rame sono tutti conservati. Vicino al sito rame T1, è presente la cavità di legame per il substrato ridotto; questa cavità è abbastanza larga da accogliere residui di varie dimensioni; le piccole molecole aromatiche, come i substrati tipici delle laccasi (DMP, guaiacolo, 2,5-xilidina, ecc.), sono completamente alloggiati nella cavità in cui le interazioni idrofobiche con i residui amminoacidici apolari predominano (Bertrand et al., 2002); i ligandi più grandi, come ABTS, assumono una struttura non lineare con una parte della molecola infilata nella cavità e una parte più esposta al solvente (Enguita et al., 2004). Questa struttura distorta permette che il ligando si approssimi al residuo reattivo dell'istidina con la parte della molecola che rilascia il suo elettrone, mentre l'altra parte del ligando interagisce con i residui amminocidici che circondano la cavità di legame del substrato.

Nella parte interna della cavità del substrato sono presenti due residui altamente conservati nelle laccasi fungine, abbastanza vicini uno all'altro (circa 5 Å): l'Asp 206 e uno dei residui che coordinano il rame T1, l'His 457 (corrispondenti a Asp 205 ed His 455 di Lcc1). Si pensa che questo residuo di istidina, inizi il ciclo catalitico sottraendo un elettrone al substrato, mentre l'aspartico carico negativamente potrebbe stabilizzare il catione radicale che si genera formando un legame idrogeno con il substrato ridotto (Piontek et al., 2002; Bertrand et al., 2002). La presenza di questo residuo polare dissociabile è stata inoltre correlata al pH ottimale per l'ossidazione del substrato; la presenza di un residuo carbossilico che interagisce con il substrato ridotto favorirebbe la deprotonazione inducendo uno spostamento dell'attività ottimale verso i valori di pH più acidi; è stato osservato che la sostituzione di questo residuo aspartico con un residuo non carico, quali l'asparagina o l'alanina, rende impossibile questo evento diminuendo l'attività della laccasi a bassi valori di pH (Madzak et al., 2006).

Oltre a questi contatti polari, un certo numero di interazioni idrofobiche proteina-ligando avvengono fra gli anelli aromatici dei substrati e le catene laterali dei residui apolari di Lcc2 che delineano parte della cavità del substrato, quali Phe 161, Phe 332 e Phe 337, corrispondenti a Val 152, a Phe 331 e a Phe 336 di Lcc1,

La differenza più vistosa fra i siti del substrato di Lcc1 e Lcc2, riguarda due residui spazialmente vicini che circondano la cavità del substrato: due residui polari, Thr 164 e Ser 264 di Lcc1 sono sostituiti da due residui idrofobici Phe 163 e Ile 265, in Lcc2. Questa variazione influenza la capacità di Lcc2 di interagire con i ligandi, in particolare con i gruppi polari eventualmente presenti sul substrato.

L'efficienza catalitica di Lcc2 verso i ligandi ingombranti che trasportano gruppi polari (per esempio ABTS) diminuisce significativamente, a causa sia di un aumento della K_M che di una diminuzione della k_{cat} (tabella 4.2), indicando una concomitante diminuzione nell'affinità per il substrato e nella cinetica di trasferimento dell'elettrone.

Come appare dalla simulazione di docking con ABTS (Fig. 4.9), il gruppo solfato della parte esposta dell'ABTS forma un legame idrogeno con il gruppo idrossile della Ser 264 di Lcc1; la presenza di un residuo apolare (Ile 265) in questa posizione in Lcc2 indebolisce l'interazione con il substrato e può giustificare l'affinità più bassa di questa isoforma laccasica rispetto a Lcc1. Per contro, l'efficienza catalitica di Lcc2 verso i piccoli substrati idrofobici (per esempio guaiacolo e DMP) mostra una diminuzione moderata rispetto a Lcc1, dovuta a un aumento di circa 5 volte dell'affinità per questi substrati (diminuzione di K_M) (tabella 4.2). L'aumento nell'affinità di Lcc2, rispetto a Lcc1, verso i ligandi idrofobici che sono all'interno della cavità del substrato potrebbe essere dovuto a un movimento indotto di chiusura della

cavità principale dovuto ai residui amminoacidici idrofobici che si trovano sul bordo della cavità. Bertrand et al. (2002) hanno osservato che la cavità del substrato della laccasi di *T. versicolor* LacIIIb legata alla 2,5-xilidina era più chiusa di quella di LacCc di *C. cinereus*. La cavità del substrato di LacIIIb è circondata da un certo numero di residui amminoacidici idrofobici superiore di LacCc; in particolare, una Leu e una Phe di LacIIIb hanno sostituito i residui di Lys e di Gln nelle posizioni corrispondenti di LacCc. La diminuzione di k_{cat} osservata in Lcc2, rispetto a Lcc1, indica che il trasferimento dell'elettrone dal substrato al rame T1 (lo step che limita la velocità di reazione nella cinetica della laccasi) deve essere influenzato dalle differenze strutturali che esistono fra le due isoforme di laccasi; tuttavia, non può escludersi, che siano stati influenzati anche il trasferimento interno dell'elettrone dal rame T1 al centro trinucleare T2T3 e poi alla molecola di ossigeno, e il rilascio del prodotto.

L'aumento significativo di inibizione da parte degli alogenuri ingombranti, quali cloruro e bromuro, dell'attività di Lcc2 rispetto a Lcc1 confermano possibili alterazioni strutturali del canale che collega il sito trinucleare al solvente.

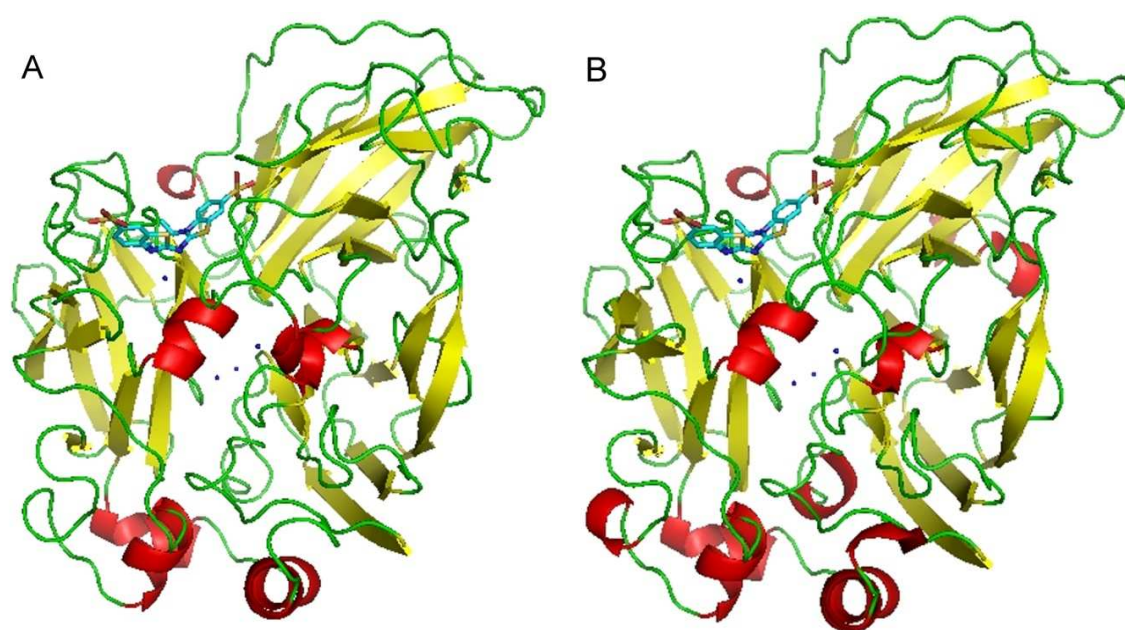


Figura 4.8 - Struttura tridimensionale delle laccasi Lcc2 (A) e Lcc1 (B) di *Trametes trogii*. Ioni rame (blu), α -eliche (rosso), β -sheets (giallo) e loops (verde). E' anche mostrato il docking con ABTS nella cavità del substrato.

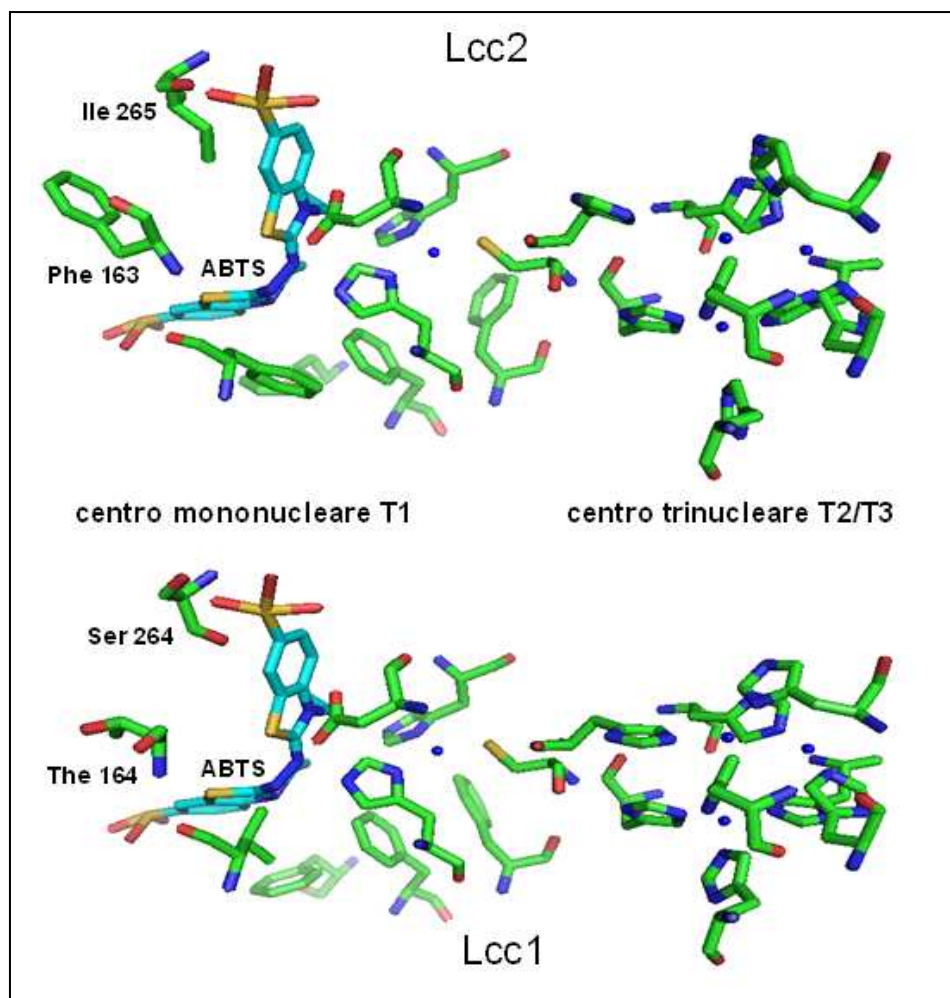


Figura 4.9 - Amminoacidi presenti nei siti rame T1 e T2T3 delle laccasi Lcc2 e Lcc1. Gli ioni rame sono mostrati in blu. E' inoltre mostrata l'interazione con la molecola di ABTS.

4.1.3 PRODUZIONE DI MUTANTI DEL GENE *lcc1*

Un differente approccio alla preparazione di enzimi con caratteristiche catalitiche vantaggiose per l'impiego in bioprocessi, consiste nella produzione di varianti mediante esperimenti di mutagenesi sito diretta. In particolare la sostituzione dell'Asp205 potrebbe influire sul pH ottimale dell'enzima. Questo residuo amminoacidico è molto conservato tra le laccasi fungine e nelle simulazioni di docking di altre laccasi simili a Lcc1 risulta impegnato in un legame H con l'ossidrile di substrati fenolici (Bertrand et al., 2002; Madzak et al., 2006). Sono state generate le mutazioni Asp205Ala/Cys/Ser, i mutanti del gene *lcc1* sono stati espressi in *P. pastoris* e le proteine corrispondenti sono state parzialmente purificate e caratterizzate. Sono state poi effettuate delle analisi comparative per valutare eventuali modifiche delle caratteristiche catalitiche della Lcc1 ricombinante e delle laccasi mutate rispetto a quelle della Lcc1 nativa

4.1.3.1 Mutagenesi del gene *lcc1*

Analisi strutturali dei residui amminoacidici che circondano il sito attivo della laccasi Lcc1 di *T. trogii* (Matera et al., 2008) suggeriscono che l'istidina in posizione 455, coordinata col centro rame T1, agisce da accettore primario di elettroni dal substrato e che l'aspartico 205, impegnato in un legame idrogeno con l'ossidrile di substrati fenolici, influenzi la dipendenza dell'attività dal pH. Questo residuo amminoacidico è stato quindi sostituito con due amminoacidi non polari (Cys e Ser) e uno carico positivamente (Lys). I mutanti sono stati costruiti usando il sistema di mutagenesi GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen) come descritto in materiali e metodi.

I frammenti contenenti i geni mutanti D205S, D205C e D205K, ottenuti dalla digestione *EcoRI-EcoRI*, sono stati clonati a valle del promotore *AOX1* nel sito unico *EcoRI* del vettore pHIL-D2.

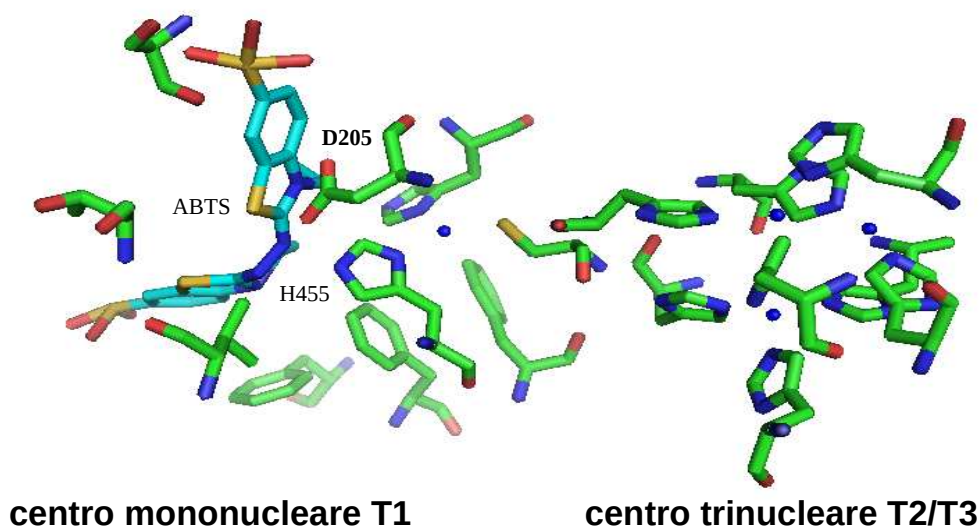


Figura 4.10 - Sito catalitico della laccasi Lcc1 di *Trametes trogii* con gli amminoacidi essenziali per l'attività catalitica.

4.1.3.2 Espressione dei geni mutati in *Pichia Pastoris*

I plasmidi pHIL-D2/D205S, pHIL-D2/D205C, pHIL-D2/D205K e il vettore privo di inserto, sono stati linearizzati con l'enzima di restrizione *StuI* ed utilizzati per trasformare cellule elettrocompetenti di *P. pastoris* GS115.

La trasformazione con plasmidi linearizzati con *StuI*, la cui sequenza di taglio è localizzata all'interno del gene *HIS4*, favorisce in *P. pastoris* eventi di ricombinazione a livello del locus *his4*. In tal modo, la maggior parte dei trasformanti dovrebbe avere un fenotipo Mut^+ , cioè essere capace di crescere efficientemente utilizzando metanolo come unica fonte di carbonio. Trasformanti con fenotipo $Muts$, che crescono lentamente su metanolo, potrebbero essere ottenuti nel caso in cui la ricombinazione avvenisse a livello del locus *AOX1*. In tutte le trasformazioni sono stati ottenuti trasformanti capaci di crescere su terreno minimo privo di istidina. I trasformanti sono stati trasferiti su terreno salino contenente metanolo, come fonte di carbonio ed induttore, e ABTS, come substrato cromogenico delle laccasi. Tutti i cloni analizzati hanno mostrato un fenotipo Mut^+ , in quanto capaci di utilizzare efficientemente il metanolo come fonte di carbonio. La formazione dell'alone verde, conseguenza dell'ossidazione del substrato cromogenico ABTS, è stato utilizzato come indice di produzione extracellulare di una forma attiva di laccasi secreta nel mezzo dai ceppi ricombinanti analizzati. Nelle piastre contenenti i trasformanti in grado di produrre laccasi in forma attiva, dopo circa 48 ore di incubazione a 30°C, si è osservata la formazione di un alone verde intorno alle colonie, che non è presente intorno alle colonie dei trasformanti ottenuti con i vettori privi di inserto. L'ossidazione del substrato cromogenico

non è stata osservata quando l'espressione del promotore AOX1 non veniva indotta con metanolo.

La coltivazione in fermentatore è stata effettuata con un bioreattore da 2 litri contenente 1100 ml di terreno salino (BS) con glicerolo e metanolo come fonti di carbonio (vedi Materiali e Metodi). Il reattore ad agitazione meccanica utilizzato presenta due turbine Rushton a sei pale (diametro, 45 mm) ed è stato equipaggiato con elettrodi per il controllo della percentuale di ossigeno disciolto (DO) e del pH, e di un dispositivo per il controllo della temperatura. Il pH della coltura è stato controllato e mantenuto al valore 5.0 utilizzando una soluzione di idrossido di ammonio (28%), che serve anche come fonte di azoto per la crescita del microrganismo. L'ossigenazione della coltura è stata garantita da un flusso di aria compressa, controllata attraverso un flussimetro. La velocità di agitazione del mezzo è stata mantenuta tra valori compresi 750 tra 900 rpm.

Il processo fermentativo per la produzione di laccasi include tre fasi, una in batch e due in fed-batch, e l'analisi della percentuale di ossigeno disciolto viene utilizzata per determinare il flusso con il quale viene aggiunta la fonte di carbonio. Infatti, la misurazione della percentuale di DO all'interno del fermentatore è stata utilizzata, dopo l'inoculo, come parametro per la determinazione dello stato metabolico delle cellule. La risalita (spike) del valore di DO, infatti, è stato utilizzato come indice di esaurimento della fonte di carbonio e ha quindi permesso di stabilire rapidamente il momento in cui era possibile iniziare i diversi feed. Nella fase iniziale (fase 1) le cellule vengono cresciute in batch utilizzando glicerolo, in eccesso; si osserva una riduzione graduale della percentuale di DO, correlata alla fase di crescita del microrganismo che utilizza la fonte di carbonio con un metabolismo di tipo ossidativo. Dopo circa 20 ore di fermentazione, si osserva un primo spike nella concentrazione di ossigeno disciolto che indica l'esaurimento del glicerolo presente nel terreno nella fase batch. Una seconda fase in fed-batch di accrescimento della biomassa è stata ottenuta aggiungendo glicerolo al 50% e si conclude con il secondo spike del valore di DO. A questo punto si induce la produzione della laccasi ricombinante aggiungendo metanolo (fase 3) come fonte di carbonio. La diminuzione del valore di DO indica la ripresa dell'attività metabolica dopo l'adattamento del microrganismo alla nuova fonte di carbonio. La produttività dell'enzima ricombinante è stata ottimizzata utilizzando colture ad alta densità cellulare, aumentando il flusso del metanolo aggiunto durante la fase di induzione ed aggiungendo ossigeno puro alle colture: infatti la regolazione accurata della concentrazione del metanolo nella coltura è indispensabile per mantenere in condizioni di induzione i geni che sono sotto il controllo del promotore dell'alcol ossidasi PAOX1, evitando allo stesso tempo l'accumulo di metanolo nel mezzo di coltura a concentrazioni tossiche per le cellule.

Durante la fase di induzione, la velocità di agitazione ed il flusso di aria sono stati modificati manualmente in modo da poter controllare l'attività metabolica del microrganismo. La quantità di metanolo aggiunto viene gradualmente incrementata utilizzando prima una soluzione di metanolo al 50% e poi al 100% e aumentando il flusso; ossigeno puro viene aggiunto alla coltura, secondo necessità, ad un flusso pari a 0.2 v/v/min per evitare che la concentrazione di ossigeno disciolto nella coltura scenda a valori inferiori al 20% del valore iniziale. Durante la fermentazione sono stati effettuati prelievi di brodo colturale per la determinazione della biomassa, dell'attività laccasica prodotta e delle proteine totali secrete. Sia i trasformanti che esprimono il gene *lcc1* che quelli che esprimono le forme mutate mostrano un profilo simile per la produzione di biomassa (Fig. 4.11) e un livello comparabile di proteina totale secreta nel brodo colturale, suggerendo che nessuna delle mutazioni influenza significativamente la produzione degli enzimi ricombinanti; tuttavia l'attività specifica dei mutanti risulta più bassa di quella della wild type (Tab. 4.4).

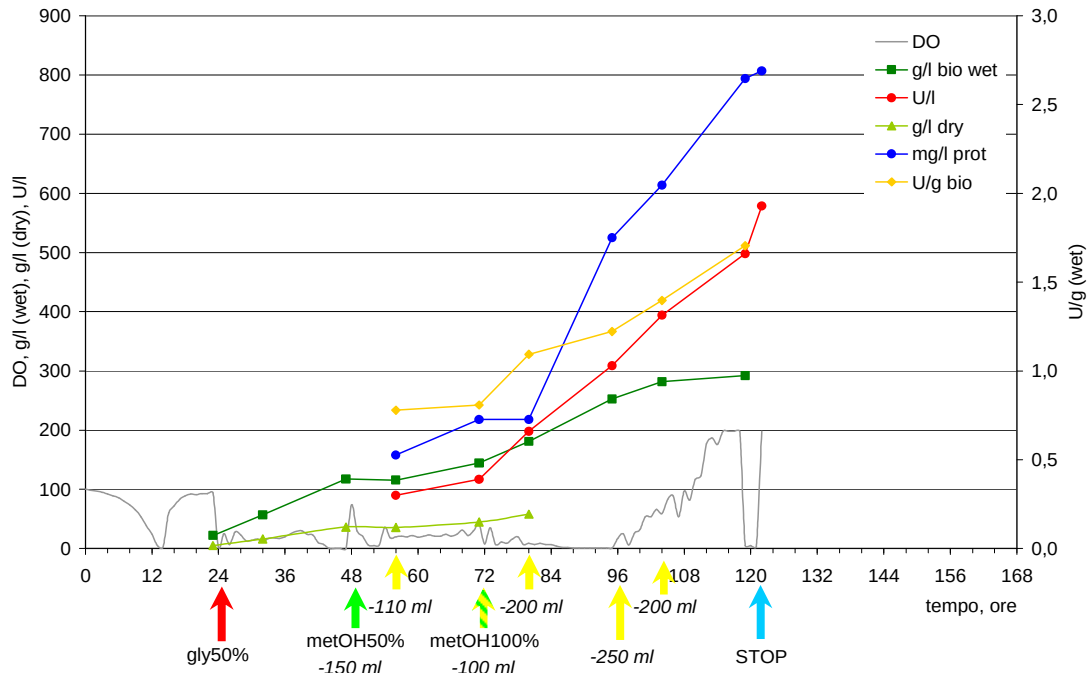


Figura 4.11 - Andamento della fermentazione del clone D205C: attività laccasica (U/l), biomassa espressa come peso secco (g/l dry), proteine totali secrete (mg/l), attività specifica rispetto alla biomassa (U/g bio).

Tabella 4.4 - Parametri di produttività delle fermentazioni in *Pichia pastoris*

	Attività laccasica U/L	Produttività (mg/l)	AS (U/mg)	AS (mg/ml) dopo cromatografia di scambio ionico
Lcc1 P.p	2520	810	3,1	152
D205C	600	807	0,7	5,61
D205S	322	535	0,6	2,39
D205K	288	247	1,16	4,68

4.1.3.3 Purificazione dei mutanti

Tutte le laccasi prodotte sono state purificate attraverso cromatografia a scambio ionico. L'introduzione della mutazione determina un cambiamento dei tempi di eluizione delle forme mutanti rispetto alla nativa. Infatti, mentre la wt viene eluita a una concentrazione di NaCl di 0,314 M, le forme mutate sono eluite a concentrazioni intorno agli 0,293 M, come mostrato in figura. 4.12.

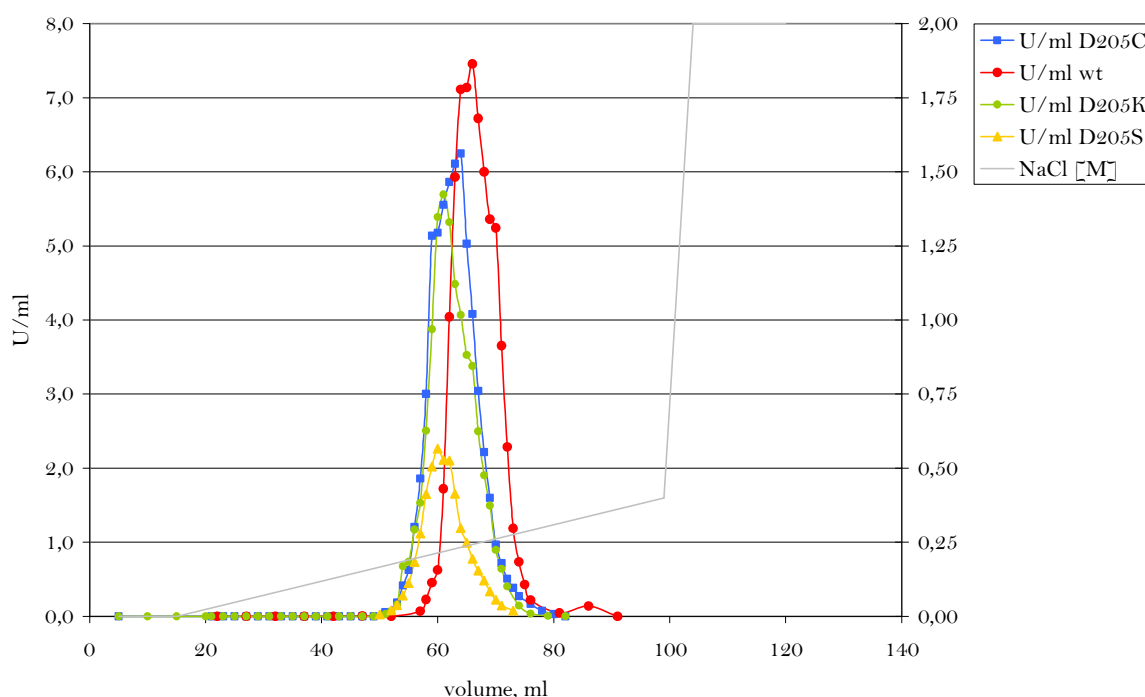


Figura 4.12 – Cromatografia a scambio ionico su Q-Sepharose Fast Flow di tutte le laccasi ricombinati (wt e mutate).

4.1.3.4 Caratterizzazione dei mutanti

4.1.3.4.1 Gel in condizioni native

Le frazioni attive di ogni cromatografia sono state riunite, concentrate e dializzate con tampone fosfato pH 6.0 e sono state analizzate tramite SDS-PAGE rilevando che ogni mutante produce un'unica banda di circa 64 kDa. Il PAGE in condizioni native (Fig. 4.13) mostra, come ci aspettavamo, che tutte le mutanti hanno una ridotta mobilità elettroforetica rispetto alla wt, che può essere attribuita all'assenza della carica negativa del residuo Asp205. Questi risultati indicano che il residuo dell'aspartato presente all'interno del sito attivo rimane accessibile al solvente.

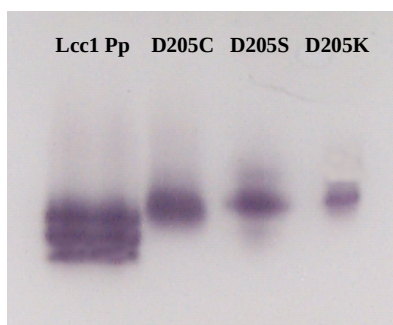


Figura 4.13 - Gel elettroforetico in condizioni native di Lcc1 e delle forme mutate.

4.1.3.4.2 Curve di attività in funzione del pH

Per valutare eventuali modifiche delle caratteristiche catalitiche della laccasi Lcc1 wt ricombinante e delle laccasi mutate rispetto a quelle della Lcc1 nativa, per tutti gli enzimi ricombinanti è stato determinato il profilo attività/pH utilizzando due substrati di tipo fenolico, il 2,6-dimetossifenolo (DMP) e il guaiacolo, e uno di tipo non fenolico, l'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS).

In un lavoro recente, Madzak et al. (2006) hanno osservato che la sostituzione del residuo aspartico della cavità del substrato della laccasi di *T. versicolor* con i residui meno polari o apolari, quali l'asparagina o l'alanina, altera l'optimum di pH per i substrati fenolici; in particolare, è stato osservato nell'optimum di pH per il DMP uno spostamento verso valori di pH più alti di 0.5 e 1.5 unità con le sostituzioni Asp→Ala and Asp→Asn rispettivamente. Per il substrato ABTS l'attività massima dei mutanti D205C, D205S e D205K, si ha al pH più acido saggio, l'attività poi diminuisce seguendo il profilo di una curva monotonicamente decrescente. La sostituzione dell'Asp205 con residui amminoacidici non polari (Cys e Ser) o un residuo polare carico positivamente (Lys) non ha determinato variazioni significative del profilo, con solo piccole differenze tra pH 2.5 e 4.0 (Fig. 4.14A).

Il profilo attività/pH delle laccasi mutate con DMP come substrato mostra invece uno spostamento del massimo di attività verso pH più vicini alla neutralità mantenendo però la forma a campana. La maggiore attività si ha a pH 3.0 per la laccasi wild type e a pH 4.0 per le forme mutate (Fig. 4.14B).

Anche con il substrato guaiacolo, l'optimum di pH mostra uno shift di 0.5 unità di pH per i mutanti D205S e D205C, mentre nessuna differenza è stata determinata per il mutante D205K (Fig. 4.14C).

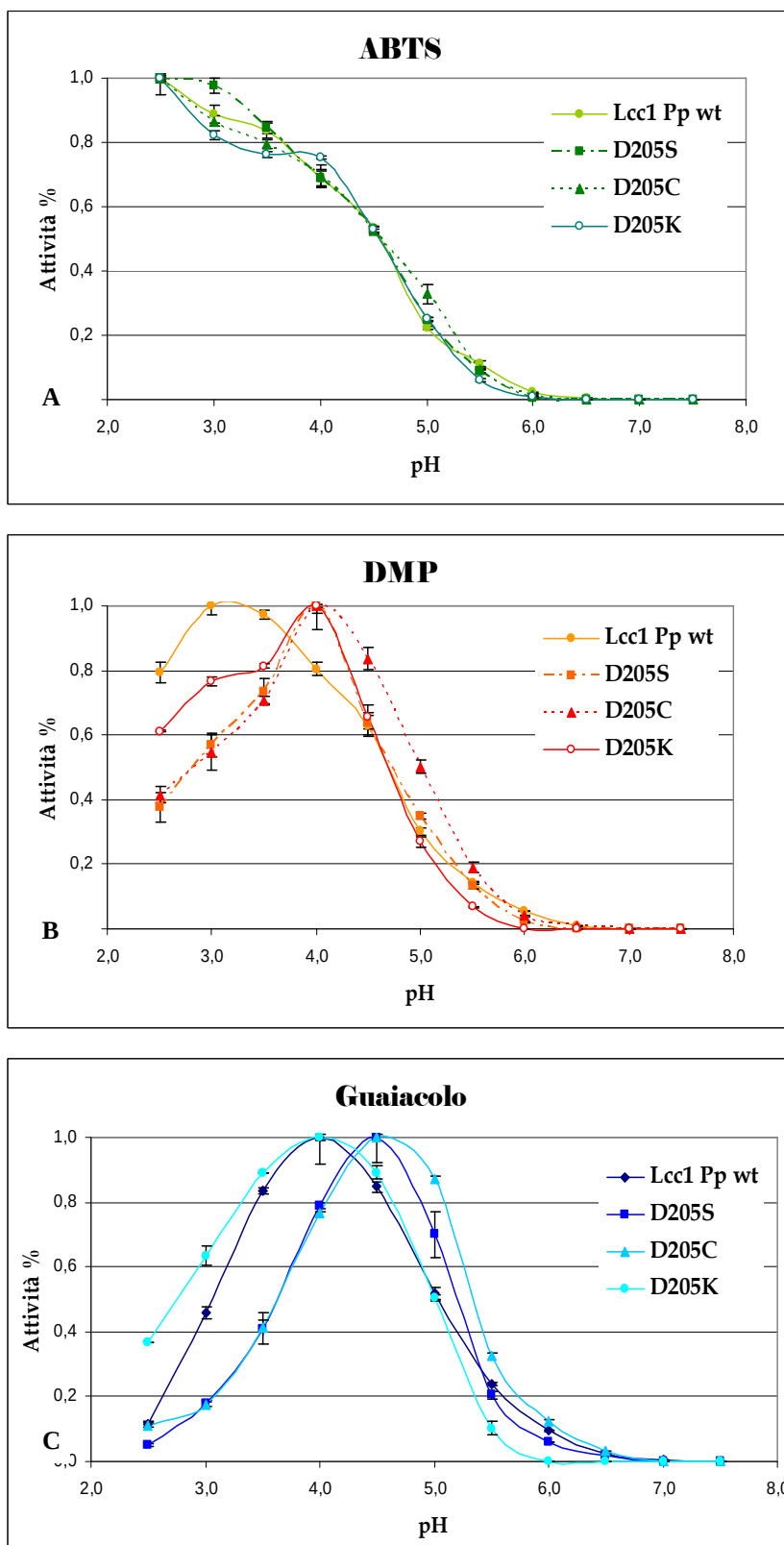


Figura 4.14 - Profili attività/pH delle laccasi ricombinanti per i tre substrati.

I risultati ottenuti indicano che il residuo amminoacidico Asp205 è particolarmente importante per la funzionalità delle laccasi. La sostituzione dell'Asp205 con amminoacidi polari non carichi o carichi positivamente determina uno spostamento dei valori di pH ottimali verso la neutralità. E' però importante notare che l'attività specifica dei mutanti analizzati è significativamente più bassa di quella della wild type e che lo spostamento del massimo di pH verso valori meno acidi potrebbe essere associato a una maggiore riduzione dell'attività a pH acidi (Fig. 4.15). La presenza di un amminoacido carico negativamente nella tasca che lega il substrato potrebbe infatti stabilizzare il radicale catione che si forma durante il meccanismo catalitico e la sua assenza potrebbe determinare una diminuzione significativa dell'attività specifica degli enzimi mutati.

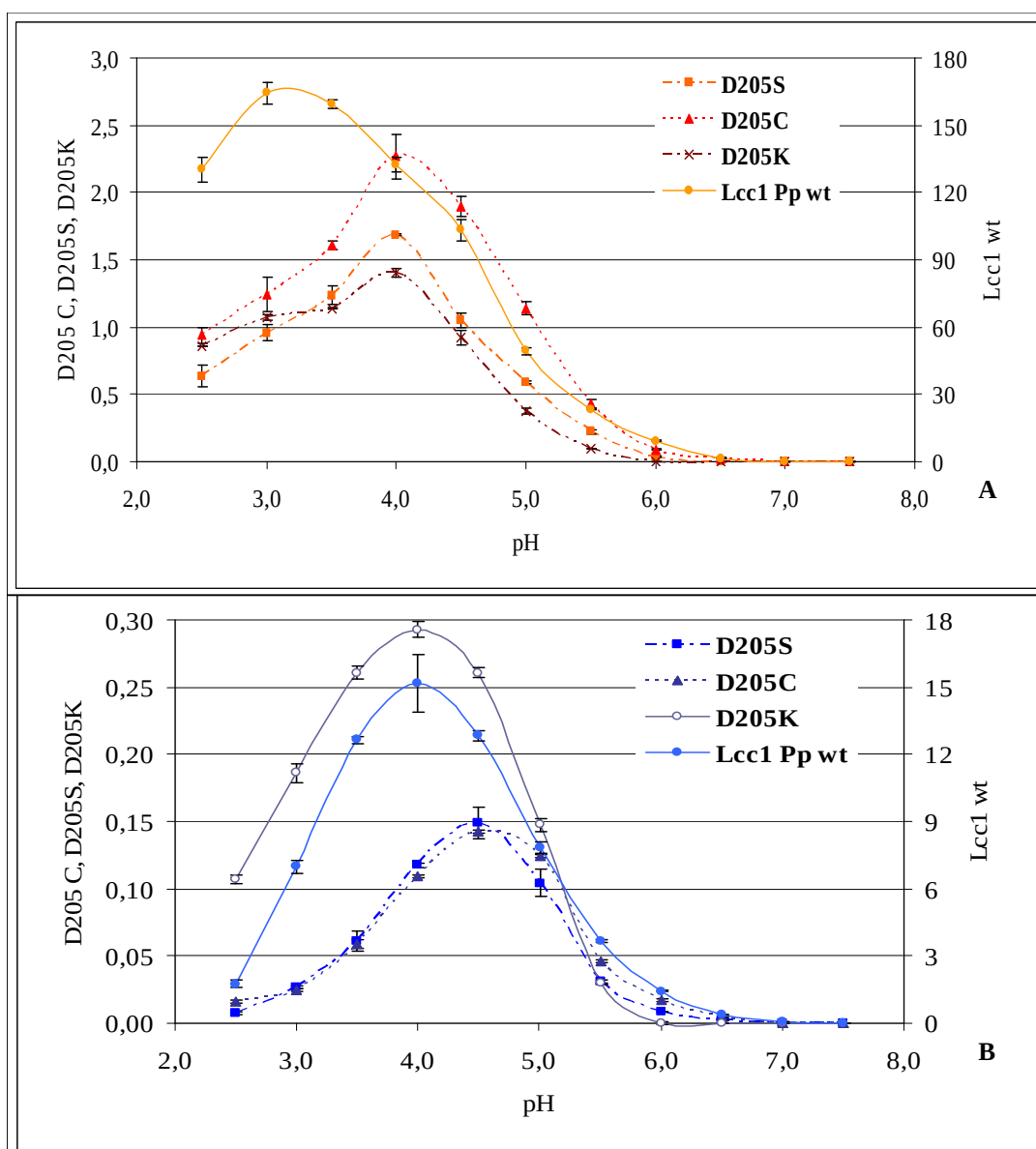


Figura 4.15 - Profilo attività specifica (U/mg) in funzione del pH con DMP (A) e Guaiacolo (B)

4.2.4.1.3 Costanti cinetiche

Per valutare meglio eventuali differenze nel meccanismo cinetico delle laccasi mutate sono stati determinati i parametri cinetici con il substrato DMP della Lcc1 ricombinante e dei mutanti D205C e D205K a differenti valori di pH. Per calcolare le costanti (K_M e V_{max}) sono stati fatti dei saggi di attività con concentrazioni di substrato comprese tra $K_M/4$ e $8 K_M$ nel range di pH 2.5-6.5 e i valori sono stati analizzati con il programma di regressione non lineare WinCurveFit (Kevin Raner Software, version 1.1.8).

La mutazione dell'aspartico 205 non ha effetti drammatici sugli andamenti qualitativi dei profili cinetici in funzione del pH, mentre altera drasticamente i valori quantitativi delle costanti, confermando un ruolo importante di questo residuo amminoacidico per l'attività dell'enzima.

La K_M decresce rapidamente tra pH 2.5 e 3.5 per tutte le ricombinanti. La K_{cat} mostra un profilo a campana con un massimo a pH 4.0 per le forme mutate e a pH 3.0 per la wt. L'effetto della mutazione introdotta sulle costanti cinetiche è quindi più significativo su K_{cat} indicando che la cinetica di trasferimento dell'elettrone è stata influenzata più dell'affinità di legame del substrato come riflette invece la K_M .

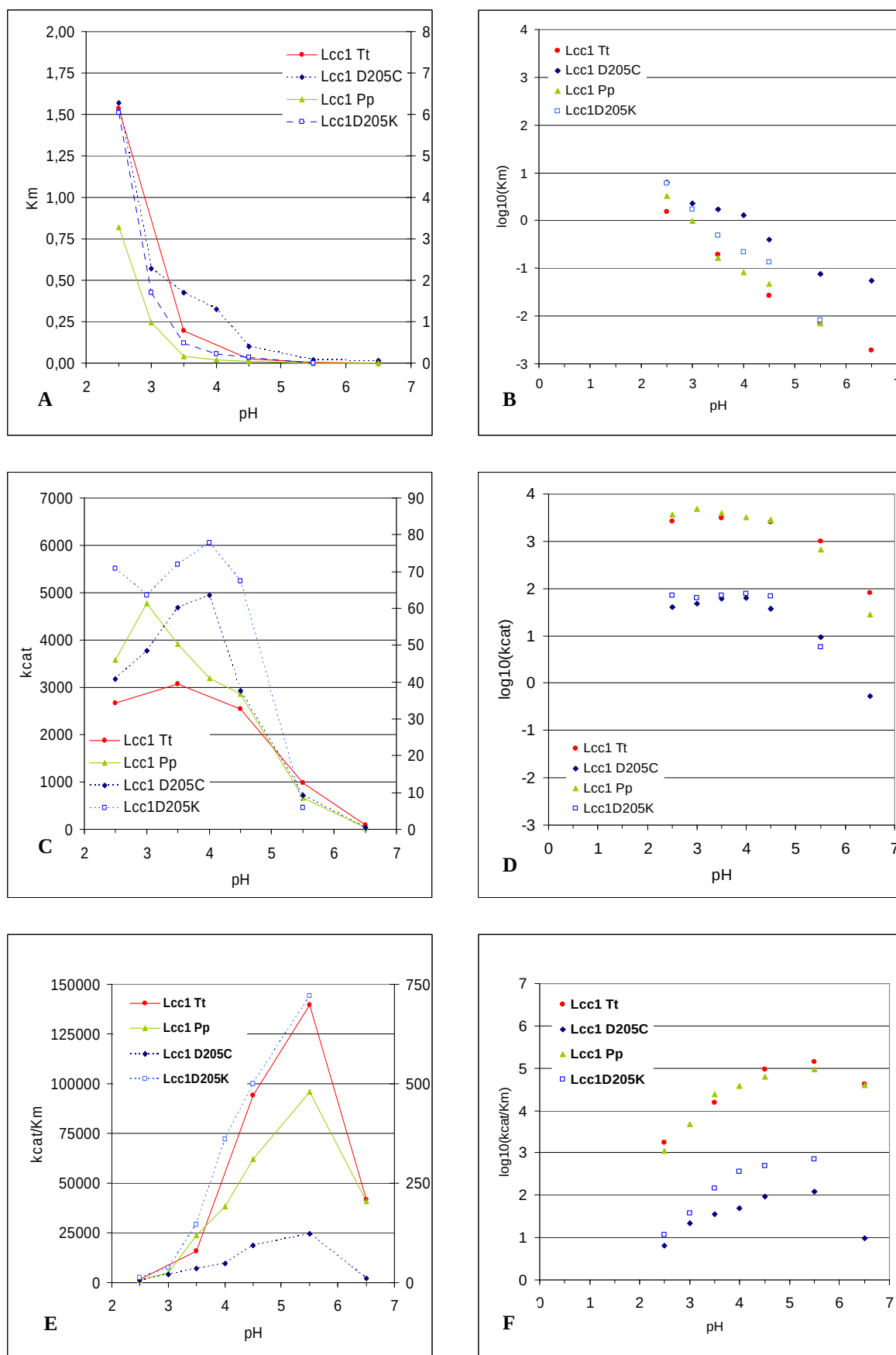


Figura 4.16 – Grafici delle costanti cinetiche in funzione del pH. A) K_M (mM); B) $\log_{10} K_M$; C) K_{cat} (min^{-1}); D) $\log_{10} K_{cat}$; E) K_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$); F) $\log_{10} K_{cat}/K_M$. Nei grafici diretti i valori delle costanti per le forme mutanti sono riportati sull'asse secondario.

4.2 PROVE DI DEGRADAZIONE

La capacità della laccasi di ossidare un'ampia varietà di composti fenolici e amine aromatiche rende il loro utilizzo particolarmente versatile in diverse applicazioni industriali.

L'interesse del mondo scientifico nei confronti dei processi biotecnologici riflette la crescente consapevolezza di cercare soluzioni economicamente ed ambientalmente sostenibili per lo smaltimento dei reflui civili ed industriali (Soetaert and Vandamme, 2006; Verstraete, 2007). In questo lavoro, la laccasi principale di *T.trogii* Lcc1 è stata provata nella degradazione di composti recalcitranti come i fenoli e i coloranti.

4.2.1 Prove di degradazione di composti fenolici con Lcc1 di *T. trogii* immobilizzata

L'impiego di enzimi immobilizzati può portare diversi vantaggi tra cui: maggiore riproducibilità delle reazioni (l'enzima può essere utilizzato in più cicli operativi, con la possibilità di recuperare il catalizzatore a fine reazione essendo in forma fisica differente da substrati e prodotti di reazione); nessuna reazione secondaria indesiderata; incremento dell'efficienza catalitica dovuta a modificazioni delle proprietà chimico-fisiche dell'enzima; incremento della stabilità operativa dell'enzima; reazioni che giungono a completamento; prodotti più facili da recuperare; maggiore controllo della reazione (l'enzima può essere separato velocemente dalla soluzione). D'altra parte ci sono possibili svantaggi o inconvenienti, quali: maggiori costi associati ai vari step iniziali, che possono poi essere aggravati se si verificano casi di ingombro sterico oppure ostacoli alla diffusione; possibile aumento della K_M ; possibili variazioni delle condizioni ottimali (temperatura, pH, ecc.).

Il processo di immobilizzazione deve mantenere la struttura tridimensionale del sito attivo, la specificità del substrato e la specificità di reazione, quindi non deve modificare le caratteristiche enzimatiche, se ciò avvenisse, le modificazioni dovrebbero almeno essere vantaggiose. Pertanto gli amminoacidi coinvolti nell'immobilizzazione non devono essere critici per l'attività dell'enzima.

Prove preliminari di degradazione sono state effettuate nella degradazione di composti fenolici da parte di Lcc1 immobilizzata per adsorbimento su *Sepharose-Con.A*.

Sono state effettuate prove di degradazione su una miscela di sette fenoli dalle caratteristiche chimiche simili (acido caffeico, acido 3-idrossi fenilacetico, acido 3,4 di-idrossi fenilacetico, acido 4-idrossi fenilacetico, acido 3-(4 idrossifenil) propionico, acido ferulico, acido p-cumarico), utilizzando l'enzima immobilizzato su colonna, sulla quale la miscela veniva fatta passare tramite un sistema di ricircolo. La degradazione è stata analizzata tramite

HPLC, monitorando la scomparsa del substrato. I dati indicano che tutti i fenoli sono degradati dall'enzima immobilizzato in quantità variabili dal 20% al 50 % (Fig.4.17). Possiamo inoltre notare che i composti che sono degradati maggiormente dalla laccasi sono i dimetossifenoli (acido 3,4-diidrossifenil acetico, acido caffeico, acido ferulico).

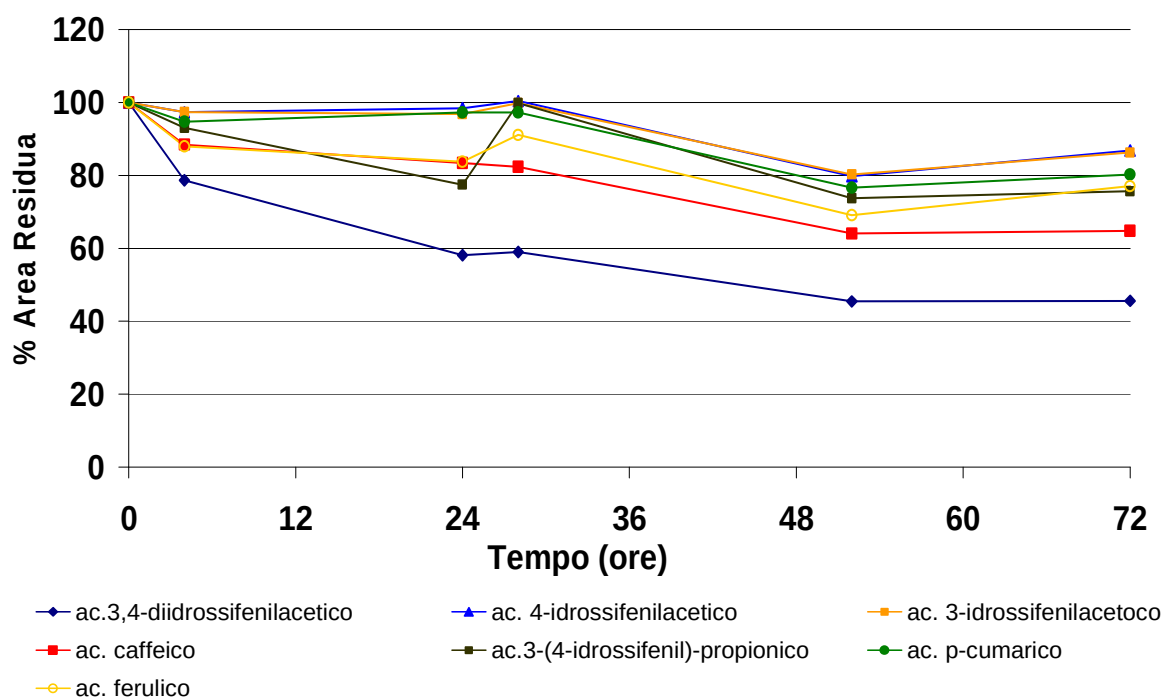


Figura 4.17 - Decolorazione della miscela di sette fenoli.

Per andare a verificare possibili fenomeni di competizione tra i vari substrati, l'esperimento è stato ripetuto con solo 3 dei 7 substrati (ac. caffeico, ac. p-cumarico e ac. 4-idrossi fenilacetico) prima in miscela e poi singolarmente (Fig. 4.18).

Nella miscela dei tre l'ac. caffeico viene degradato in misura maggiore (85% in circa 70 ore), mentre da solo è degradato completamente in circa 20 ore. Un aumento della velocità di degradazione nella miscela dei tre e nel composto singolo, rispetto alla miscela dei 7 fenoli, è riscontrabile, anche se in misura notevolmente più ridotta, anche per l'ac. p-cumarico. Il terzo substrato invece è recalcitrante alla degradazione in ogni caso. Questi dati indicano l'esistenza di forte competizione tra i substrati.

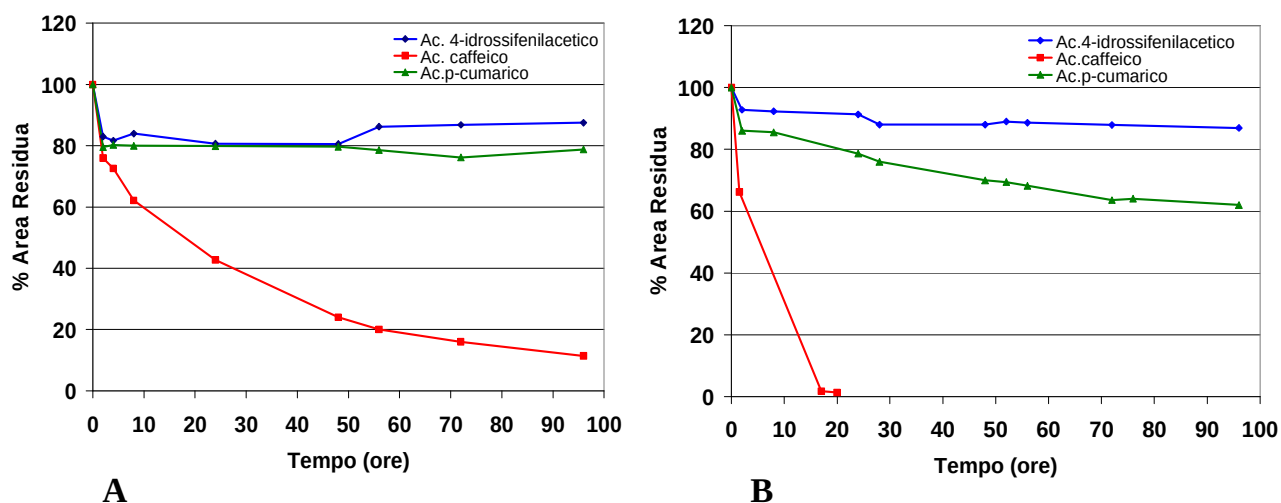


Figura 4.18 - Decolorazione nel tempo dei tre fenoli in miscela (A) e singoli (B) su colonna.

Si è poi passati a esperimenti in batch, in cui l'enzima immobilizzato è posto a contatto della soluzione contenente i substrati da degradare e in continua agitazione, utilizzando sempre le stesse condizioni di pH e concentrazione dei substrati.

Per la miscela dei 3 substrati la degradazione è sempre più rapida che in colonna: l'ac. caffeico è degradato completamente in poche ore, anche il p-cumarico è degradato completamente in tempi più lunghi e l'ac. 4-idrossifenilacetico è degradato al 60% dopo 60 ore. Ancora più rapida è la degradazione dei fenoli singoli, che raggiunge la quasi completezza anche per il substrato più recalcitrante, l'ac. 4-idrossifenilacetico (Fig. 4.19).

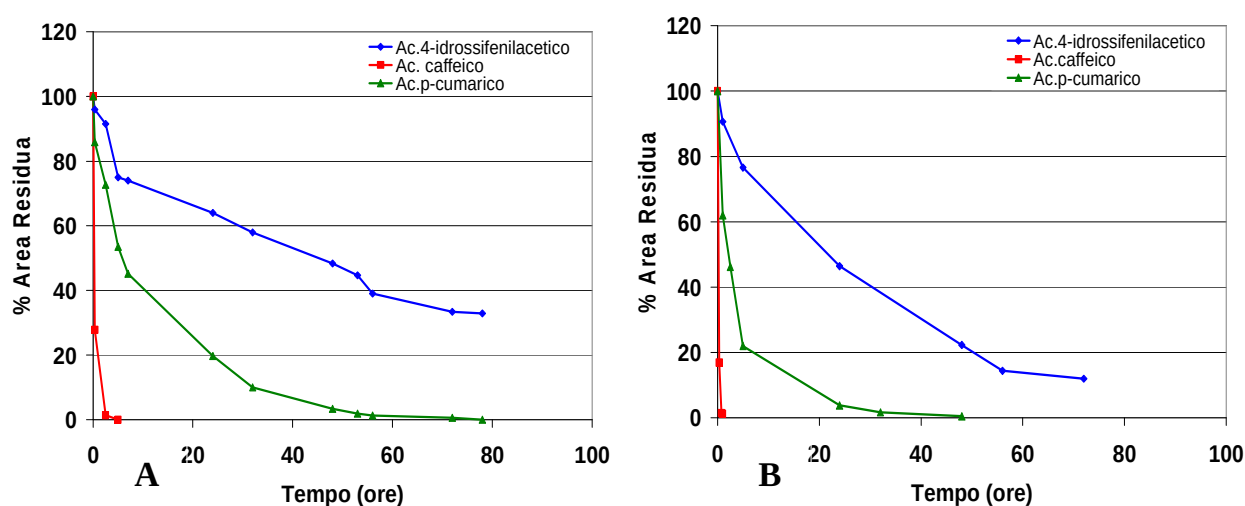


Figura 4.19 - Decolorazione nel tempo dei tre fenoli in miscela (A) e singoli (B) in batch.

In ogni caso, nelle prove in batch, il contatto continuo tra i substrati e la resina con l'enzima immobilizzato e in continua agitazione ci permette di ottenere una degradazione

molto più efficiente. L'utilizzo del sistema in batch, che permette di ottenere risultati migliori del sistema in ricircolo su colonna, è stato quindi applicato anche per la degradazione di coloranti.

4.2.2 Prove di degradazione di coloranti con Lcc1 di *T.trogii* immobilizzata

Il sistema di laccasi immobilizzata in batch è stato applicato alla degradazione di 3 coloranti ampiamente utilizzati in industria tessile o alimentare, come l'alizarina, l'amaranto e l'indaco appartenenti a differenti classi strutturali (antrachinonici, diazoici e indigoidi, rispettivamente).

I coloranti analizzati singolarmente sono degradati in misura diversa: alizarina completamente in poche ore, amaranto solo per un 15% e indaco per circa il 45% in 48 ore (Fig. 4.20).

Ai coloranti non completamente degradati è stato quindi aggiunto un mediatore (ac. violurico o HBT, 1mM). In questo caso anche l'amaranto e l'indaco vengono degradati completamente in poche ore in presenza di acido violurico. L'HBT permette la degradazione completa dell'indaco, ma in tempi più lunghi (72 ore), mentre l'amaranto raggiunge una degradazione di circa il 60% in 48 ore (Fig. 4.21).

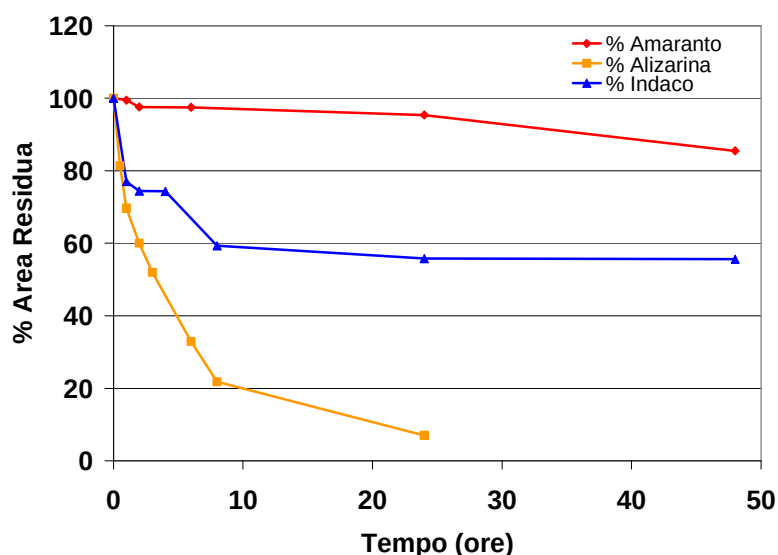


Fig. 4.20 - Decolorazione nel tempo dei tre coloranti (amaranto, alizarina e indaco) senza mediatore.

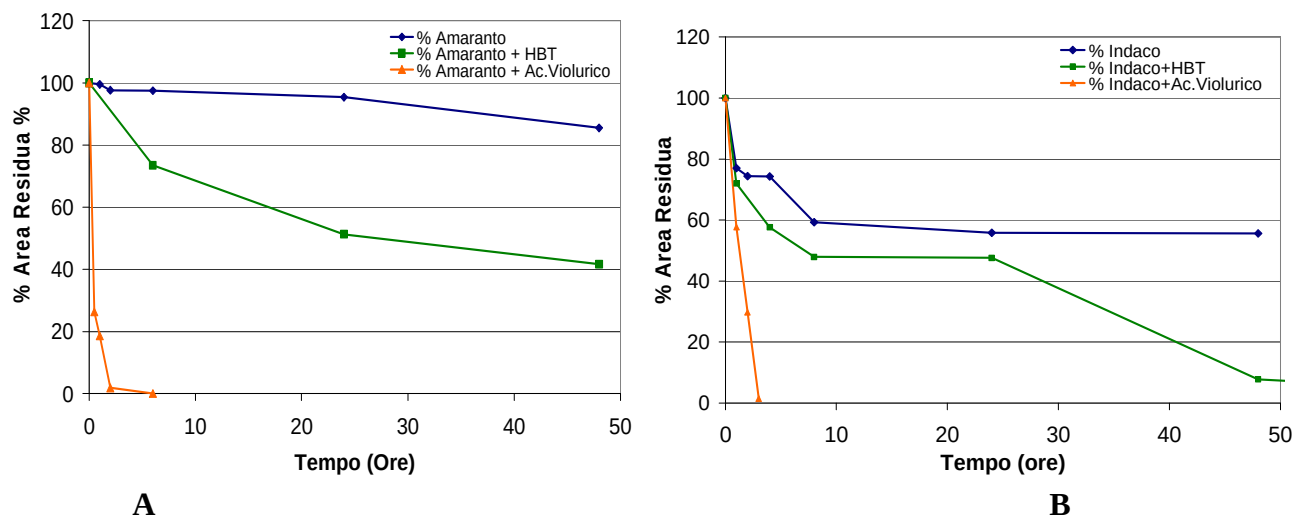


Figura 4.21 - Decolorazione dell'amaranto (A) e dell'indaco (B) in presenza di mediatori.

Sono state poi effettuate delle prove in miscela per verificare se la presenza contemporanea di più coloranti incidesse sulla cinetica di decolorazione; sono state esaminate due miscele dei coloranti alizarina e amaranto, contenenti 0,2 g/l e 0,4 g/l di ciascun colorante.

I risultati indicano che la presenza dei due coloranti contemporaneamente non influenza la capacità degradativa dell'enzima e che un aumento della concentrazione dei coloranti comporta un effetto di rallentamento della degradazione di minima entità (Fig. 4.22).

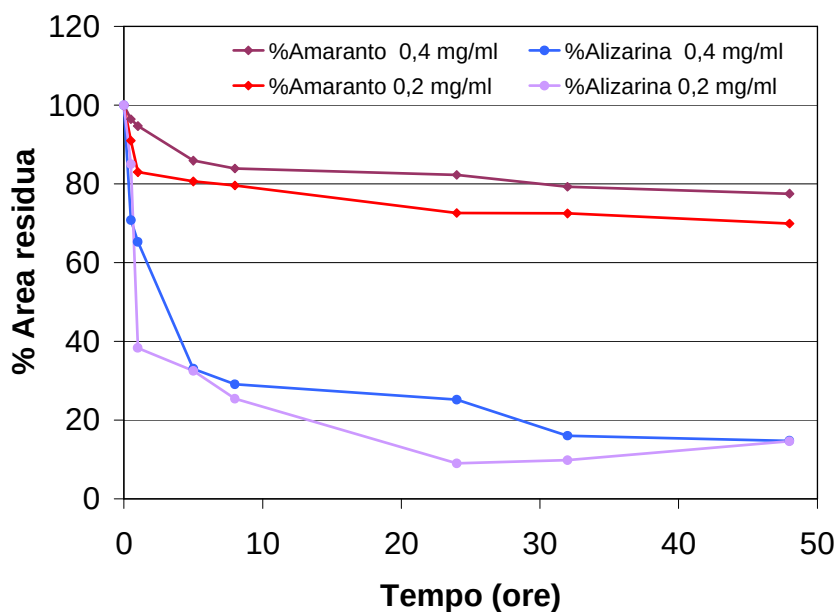


Figura 4.22- Decolorazione della miscela amaranto e alizarina a diverse concentrazioni.

4.2.3 Prove di decolorazione in “Microtiter Plate”

Verificata positivamente la capacità della laccasi Lcc1 di *T.trogii* di degradare coloranti di varia natura chimica, per analizzare un numero maggiore di coloranti si è passati all'utilizzo di un metodo di screening rapido in microtiter plates.

I processi enzimatici di decolorazione dei reflui emergono infatti come processi alternativi ai classici metodi di rimozione chimico-fisici spesso poco efficienti e costosi. Tuttavia anche i metodi biologici presentano ancora degli aspetti critici quali alti costi associati con la produzione e la purificazione degli enzimi, l'inattivazione di questi durante le reazioni, il pH ottimale per l'attività piuttosto acido e la necessità di un mediatore redox, per esempio ABTS, acido violurico o HBT, per ossidare efficientemente composti recalcitranti (Johannes e Majcherczyk, 2000a; Torres et al., 2003; Moldes and Sanroman, 2006). L'uso dei mediatori è sicuramente tra i principali svantaggi a causa del relativo alto costo, della dose richiesta spesso elevata, della biodegradabilità limitata e della potenziale tossicità (García O, et al., 2003). Il metodo in microtiter ci ha permesso di individuare alcune delle numerose variabili che incidono sull'efficienza del processo di decolorazione.

Abbiamo preso in considerazione dei coloranti utilizzati in industria tessile o alimentare che presentano struttura variabile: azoici (amaranth, carmoisine, new coccine, sunset yellow), antrachinonici (remazol brilliant blue R), triarilmetano (patent blue) e indigoidi (indigo).

Il lettore di micropiastre effettua una scansione sequenziale di ogni pozzetto nell'intervallo di lunghezza d'onda selezionato. Oltre a questo parametro è possibile impostare la velocità con cui lo strumento effettua le letture, che influenza direttamente la qualità dello spettro ottenuto. Per ottenere un buon rapporto tra velocità e qualità dello spettro è possibile accorciare l'intervallo all'interno del quale viene fatta la scansione. Nel nostro caso abbiamo scelto di dividere i coloranti in due gruppi, la serie blu che viene analizzata tra 700 e 550 nm e la serie rossa tra 550 e 450 nm. Inoltre è possibile impostare il numero e la durata dei cicli in modo che lo spettrofotometro vada a leggere agli intervalli di tempo prefissati. Tutte le prove sono state effettuate in triplicato.

Su questi coloranti abbiamo fatto una prova preliminare in presenza di Lcc1 con e senza mediatori nelle condizioni descritte in materiali e metodi. Come possiamo vedere anche dagli istogrammi riassuntivi (Fig. 4.23), che riportano la percentuale di decolorazione, la degradazione è molto più veloce in presenza di mediatori, in particolar modo con acido violurico, che porta alla completa decolorazione di tutti i coloranti dopo sole due ore.

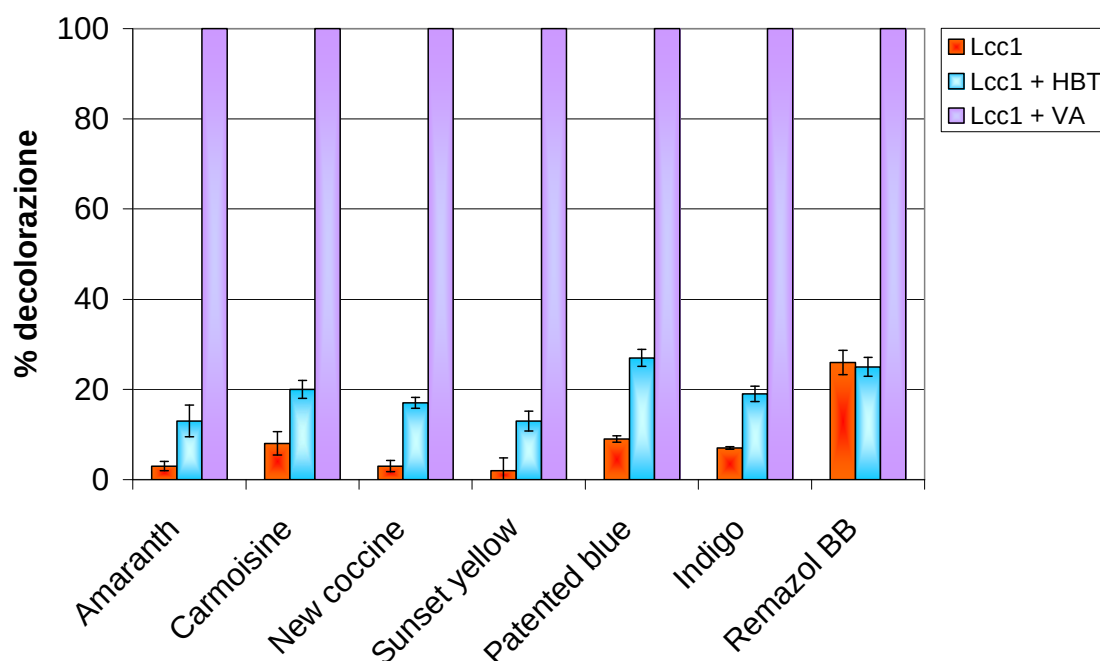


Figura 4.23 - Degradazione dei coloranti con e senza mediatori dopo due ore.

Si è inoltre analizzato l'effetto del pH nella miscela di reazione, effettuando delle prove di degradazione a pH 3.0, 4.0 e 5.0, sui coloranti della serie rossa, utilizzando acido violurico come mediatore. Queste prove indicano che la maggiore attività di Lcc1 di *T. trogii* è a pH 4.0 (Fig. 4.24). Il pH scelto per tutti i gli esperimenti di decolorazione è stato però 5.0 perché anche se Lcc1 nativa esibisce più alta attività a pH 4.0, l'enzima non è molto stabile a questo valore, mentre risulta più stabile a pH 5.0 al quale presenta comunque una buona attività.

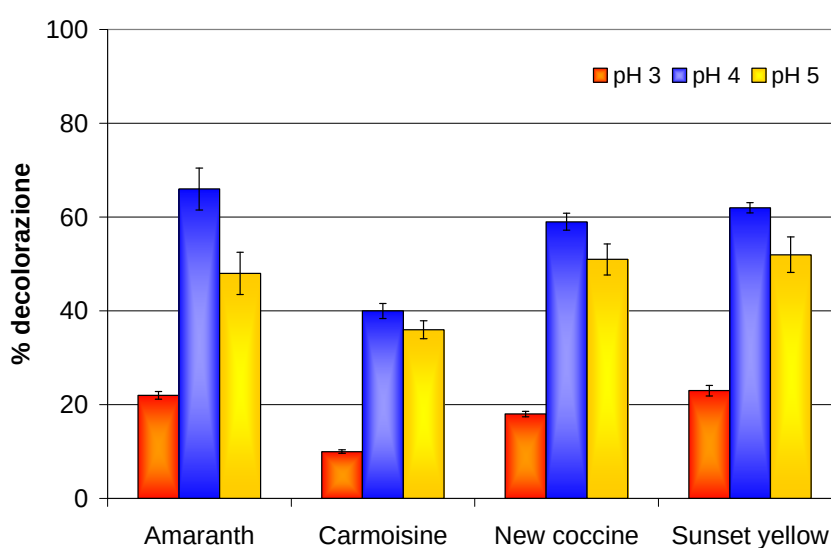


Fig. 4.24 - Decolorazione dei coloranti azoici a tre diversi valori di pH dopo 2 ore in miscela di reazione con 5 mU di enzima nativo e acido violurico 1 mM.

E' stato poi analizzato l'effetto della concentrazione della laccasi Lcc1 di *T.trogii* sulla decolorazione, prima mantenendo il mediatore acido violurico a concentrazione costante e poi variandolo proporzionalmente all'enzima stesso. Queste prove sono state effettuate solo sui coloranti della serie rossa.

I risultati sperimentali dimostrano, come atteso, che la concentrazione della laccasi ha una notevole influenza sulla decolorazione. Infatti la più alta quantità di enzima (10 mU/ml) porta a una completa degradazione di tutti i coloranti dopo 2 ore (Fig. 4.25A). Anche impiegando 7,5 mU/ml di enzima in presenza di mediatore 1 mM si ottiene una decolorazione del 100%, ma questo risultato è raggiunto in tempi più lunghi.

Nel caso in cui alle stesse concentrazioni di enzima dell'esperimento precedente viene associata una minore quantità di mediatore, proporzionale alla quantità di enzima utilizzata (fig.4.25B), si hanno comunque risultati soddisfacenti e comparabili a quelli ottenuti con una concentrazione costante di mediatore, 1 mM.

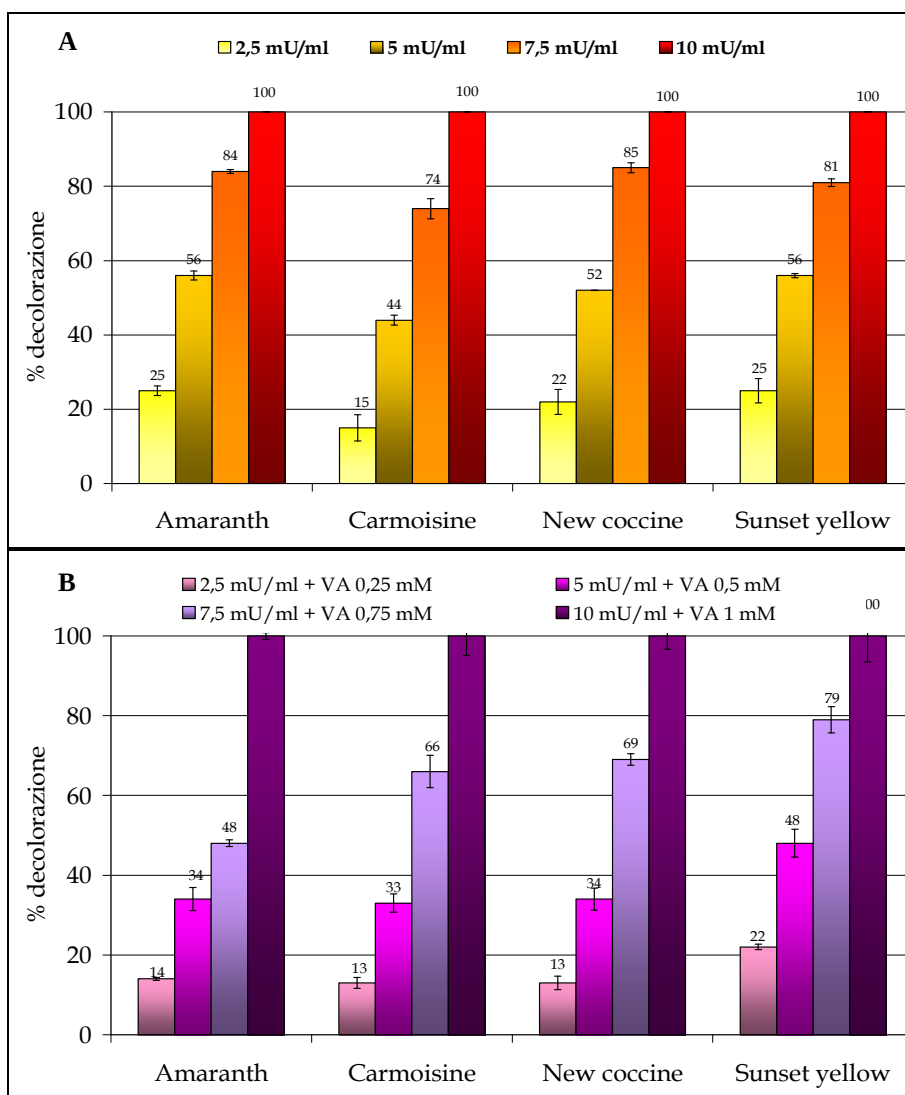


Figura 4.25 - Degradazione dei coloranti rossi a diverse concentrazioni di enzima, mantenendo costante la concentrazione del mediatore a 1 mM (A) e variando proporzionalmente la concentrazione del mediatore (B), dopo 2 ore.

Come ulteriore prova si è voluto indagare se la presenza di mediatori fosse indispensabile per la degradazione dei coloranti da parte di Lcc1. L'esperimento è stato condotto sul solo amaranto in assenza di mediatori aumentando di molto la concentrazione di enzima. I risultati sperimentali hanno dimostrato che questi ultimi non sono indispensabili per il meccanismo catalitico della decolorazione. Dal grafico che riporta la percentuale di decolorazione, si può osservare, come ci si aspettava, che la velocità della decolorazione aumenta all'aumentare della concentrazione di laccasi (Fig. 4.26), anche se per ottenere una buona degradazione (circa il 60% dopo 6 ore) è necessario utilizzare quantità elevate di enzima.

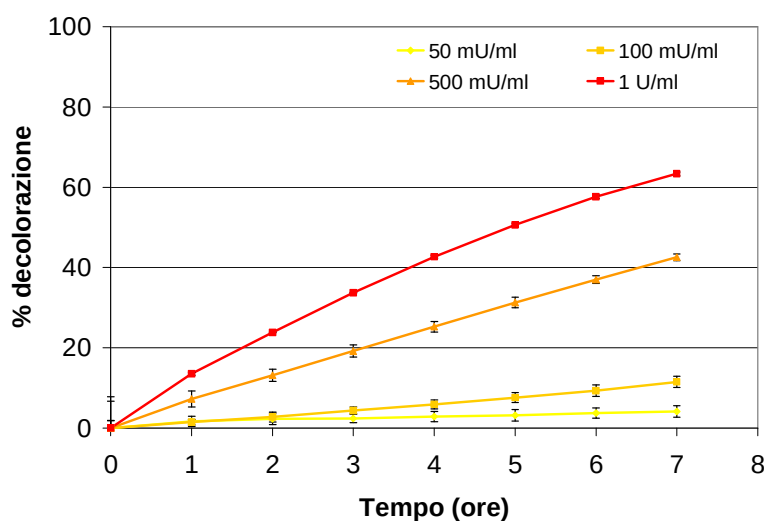


Figura 4.26 - Decolorazione dell'amaranto all'aumentare della concentrazione di enzima senza mediatori.

A questo punto, questo tipo di esperimenti è stato usato per effettuare un'analisi comparativa tra Lcc1 di *T. trogii* e la forma ricombinante in *P. pastoris*.

Sono state scelte le condizioni in cui non si otteneva una completa decolorazione ed era quindi possibile seguire l'andamento nel tempo e rilevare possibili differenze: 100mU/ml di E senza mediatori; 10mU/ml di E + 1mM di HBT e 2,5mU/ml di E + 1 mM AV.

In assenza di mediatori (Fig. 4.27A) l'enzima nativo degrada i coloranti più velocemente rispetto alla forma ricombinante, mentre in presenza di mediatori la laccasi ricombinante in *Pichia pastoris* risulta più efficiente. L'HBT mostra sempre una minore efficienza, rispetto all'acido violurico, nel coadiuvare la laccasi nella degradazione dei coloranti; infatti, nonostante la quantità di enzima impiegato (10 mU/ml) sia quattro volte superiore rispetto a quella utilizzata in presenza di acido violurico (2,5 mU/ml), la decolorazione raggiunge il 100% in un minor numero di casi e in tempi più lunghi (fig. 4.27 B e C). Le differenze riscontrate nell'attività tra la forma nativa e la ricombinante potrebbero derivare da una

diversa glicosilazione e/o da un diverso folding della proteina, dovuti all'espressione eterologa. Infatti, l'organismo ospite *P. pastoris*, nel quale è stato espresso Lcc1, iperglicosila le proteine prodotte. Risultati precedenti mostravano appunto un peso molecolare leggermente superiore della forma ricombinante rispetto alla nativa, proprio a causa della maggiore glicosilazione.

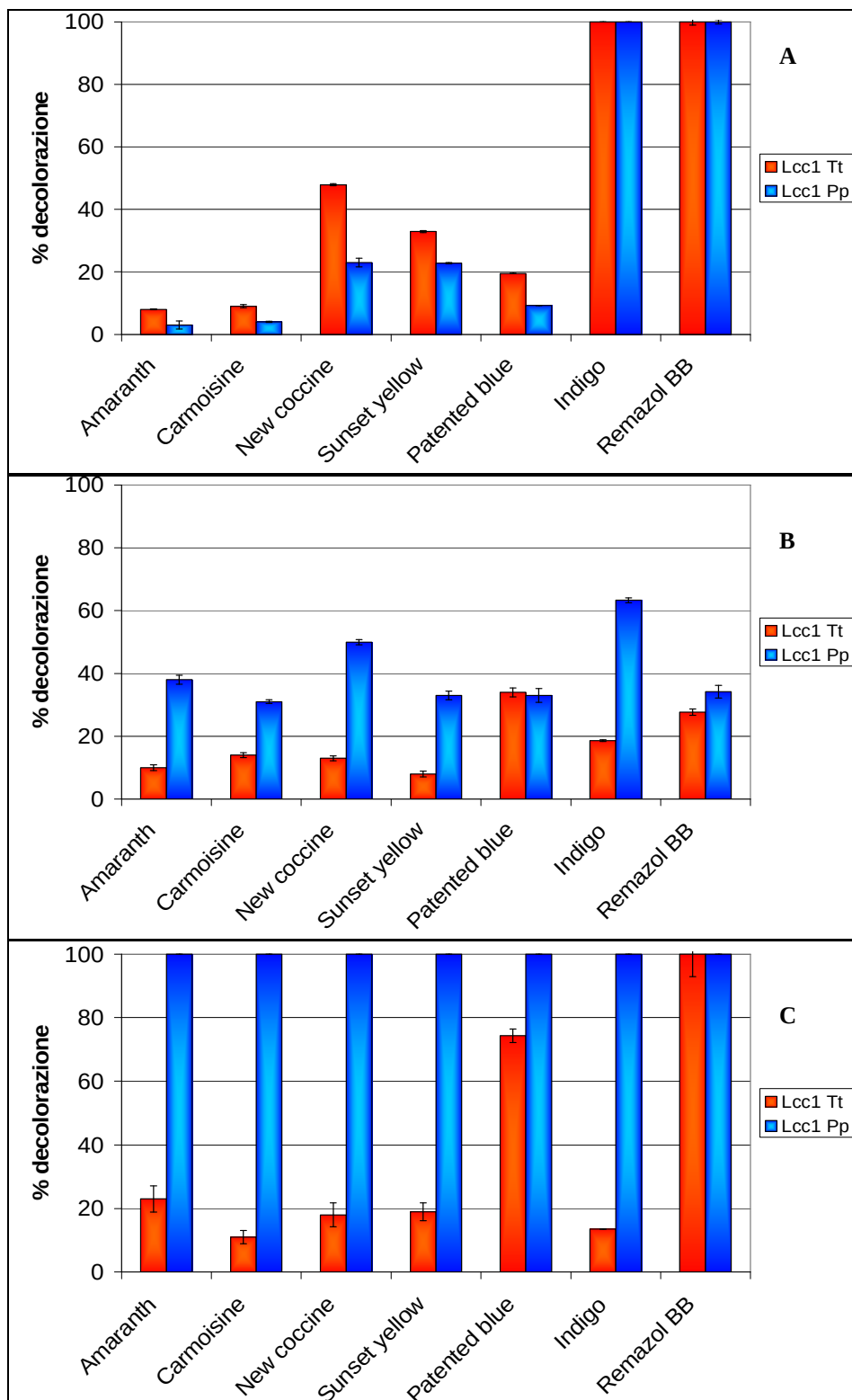


Figura 4.27 - Decolorazione con enzima nativo e ricombinante dopo 2 ore in tre diverse condizioni: A) 100 mU di enzima; B) 10 mU di enzima e 1 mM HBT; C) 2.5 mU di enzima e 1 mM acido violurico.

L'analisi dell'efficienza di decolorazione è stata anche estesa all'enzima espresso in *S. cerevisiae* (Lcc1Sc) e *K. lactic* (Lcc1KI) confermando che l'ospite può influenzare la capacità degradativa di questa proteina. In presenza del mediatore HBT, la decolorazione di tutti i coloranti testati è maggiore per le laccasi ricombinanti; solo in un caso (patent blue) la ricombinante in *S. cerevisiae* sembra meno efficiente della nativa (Fig. 4.28).

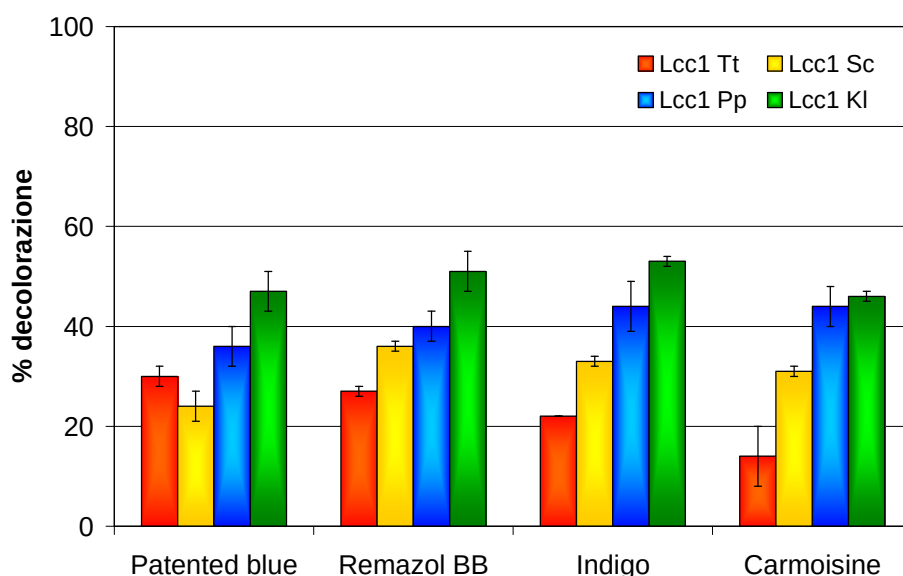


Figura 4.28 – Decolorazione enzimatica con 10 mU di enzima nativo e ricombinante in presenza di 1 mM HBT dopo 2 ore.

4.2.4 Ottimizzazione del processo di decolorazione con Lcc1 di *T.trogii*

Le prove di decolorazione in microtiter ci hanno fornito dei dati preliminari sulle principali variabili che influenzano il processo di decolorazione. Tuttavia per avere un processo efficiente e competitivo è di grande utilità individuare sistemi che consentano l'ottimizzazione del processo analizzando contemporaneamente le diverse variabili.

Recentemente, è stata ampiamente utilizzata per l'ottimizzazione dei processi enzimatici la metodologia della superficie di risposta (RSM) (Lee et al., 2003; Schepers et al., 2003).

L'RSM è stata applicata con successo nell'ottimizzazione dei parametri di coltura nella produzione di enzimi lignolitici, nella decolorazione dei coloranti con colture fungine (Nagarajan and Annadurai, 1999; Trupkin et al., 2003); e per l'ottimizzazione del mediatore redox in processi di sbiancamento della polpa di cellulosa con laccasi (García, 2003). Questo metodo è stato usato anche recentemente per l'ottimizzazione della decolorazione del

colorante reactive black 5 (RB-5) usando la laccasi purificata del fungo white-rot, *Pleurotus sajor-caju* (Murugesan et al., 2007); per l'ottimizzazione della decolorazione del colorante methylene blue (MB) da parte della lignina perossidasi (LiP) con l'enzima prodotto dal fungo white-rot *Phanerochaete chrysosporium* (Alam et al., 2008); e per l'ottimizzazione dei parametri, pH, temperatura e concentrazione di enzima nella degradazione dei coloranti, reactive red 239 (RR239), reactive yellow 15 (RY15) e reactive blue 114 (RB114) con una laccasi commerciale (Tavares et al., 2008).

Abbiamo quindi scelto come coloranti modello l'amaranto, un colorante tessile molto recalcitrante di tipo azo, che necessita per la degradazione di mediatore, e il remazol brilliant blue R della famiglia degli antrachinonici che viene abbastanza degradato dal nostro enzima anche in assenza di mediatore.

4.2.4.1 Ottimizzazione per il colorante amaranto

Per il colorante amaranto il metodo RSM è stato applicato per ottimizzare 5 variabili, concentrazione di colorante (Amaranto: $0,02 \div 0,1$ mg/ml), pH ($3,0 \div 6,0$), mediatore redox ($0,1 \div 1$ mM), unità di enzima ($2,5 \div 10$ mU/ml), tempo ($0 \div 6$ ore) utilizzando il programma MODDE 5.

La significatività statistica del modello è stata analizzata tramite l'analisi della varianza (ANOVA). Il modello presenta un alto coefficiente di correlazione R^2 (0,968), e un alto potere predittivo indicato dal valore di Q^2 (0,938) (Fig. 4.29). Nella tabella ANOVA sono riportati i valori di Q^2 e R^2 , DF (gradi di libertà), SS (somma dei quadrati), MS (media quadratica), il p-value e l'F-value. Il p-value inferiore a 0,05 indica che i coefficienti di regressione e le interazioni tra ogni variabile indipendente possono essere considerati statisticamente significativi con un intervallo di confidenza del 95%. (Tab. 4.5).

Il *lack of fit plot* (Fig. 4.30) compara il *lack of fit* (errore modello) con l'errore puro. La prima barra (SD-LOF) rappresenta la deviazione standard del *lack of fit*, la terza barra (SD-LOF) rappresenta la deviazione standard dell'errore puro moltiplicato per la radice quadrata dell'*F* critico (il valore della distribuzione di *F* sopra il quale SD-LOF è significativa al 95%). La prima barra più alta della terza indica che il modello ha un significativo *lack of fit*. Per il colorante amaranto la terza barra più alta della prima indica un buon modello con un *lack of fit* statisticamente non significativo il cui valore (0,059) è riportato nella tabella ANOVA (Tab. 4.5).

Il *Normal Probability Plot* mostra che i valori sono normalmente distribuiti lungo una retta e non sono presenti valori errati (Fig. 4.31).

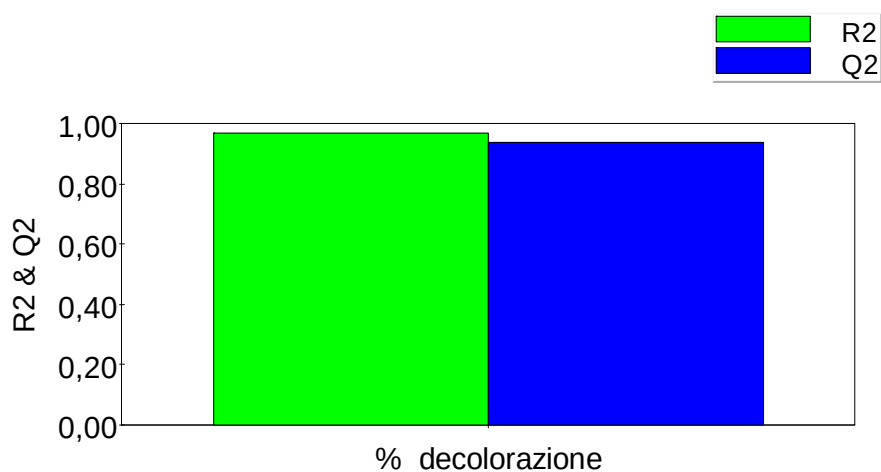


Figura 4.29 - *Summary of fit plot*, riporta i valori di R^2 e Q^2 per il colorante amaranto.

Tabella 4.5 – Analisi della varianza (ANOVA) per il colorante amaranto

% decolorazione	DF	SS	MS	F	p	SD
			(variance)			
Total	87	62283,2	715,898			
Constant	1	23657,7	23657,7			
Total Corrected	86	38625,5	449,133			21,1928
Regression	20	37388,2	1869,41	99,722	0,000	43,2367
Residual	66	1237,25	18,7462			4,32969
Lack of Fit (Model Error)	63	1229,59	19,5174	7,64698	0,059	4,41785
Pure Error (Replicate Error)	3	7,65689	2,55229			1,59759
N = 87	Q2 = 0,938	Cond. no. = 9,2057				
DF = 66	R2 = 0,968	Y-miss = 0				
	R2 Adj. = 0,958	RSD = 4,3297				

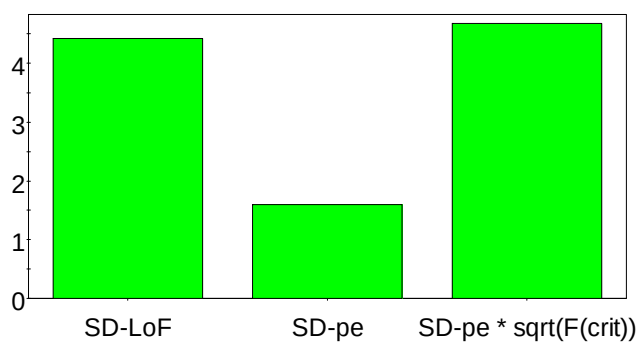


Figura 4.30 – *Lack of fit plot* per il colorante amaranto

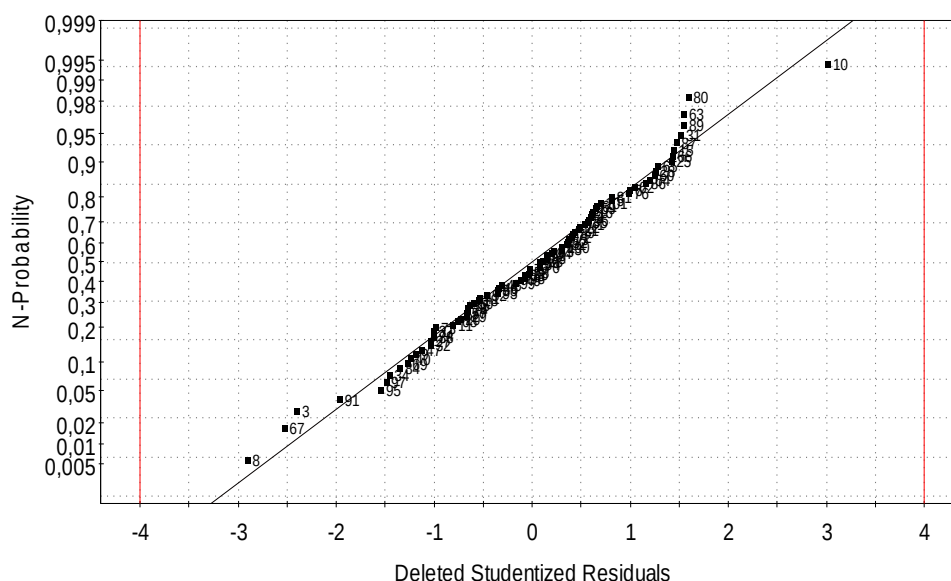
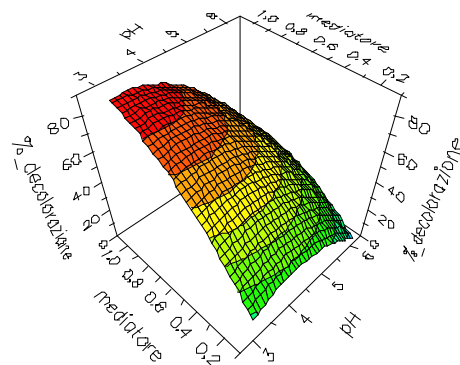
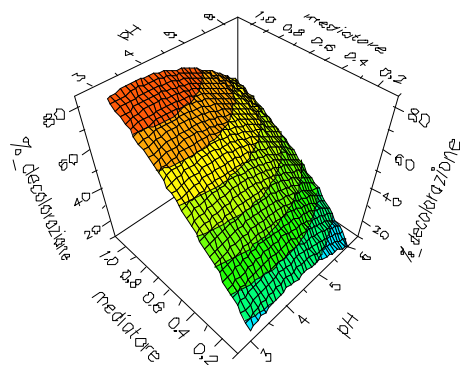


Figura 4.31 - *Normal Probability Plot* per il colorante amaranto

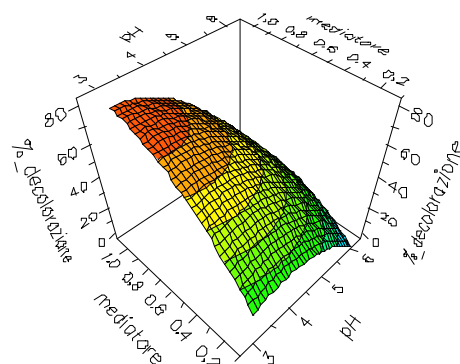
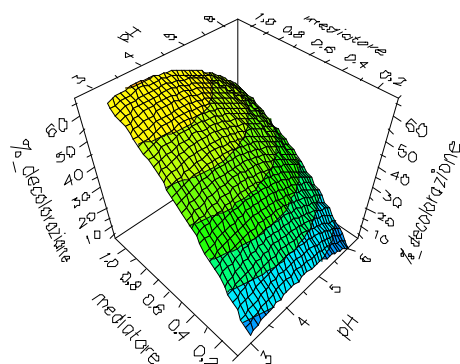
Una volta verificata l'attendibilità del modello si è passati alla predizione. L'ottimizzazione ci permette di trovare le condizioni migliori per un desiderato profilo delle nostre risposte, aiutandoci a interpretare i risultati e a trovare una regione di operabilità.

L'analisi delle superfici di risposta per l'amaranto indica che alla concentrazione di colorante 0,02 mg/ml dopo solo 1 ora, in presenza di mediatore 1 mM, abbiamo una decolorazione dell'84% con 10 mU/ml di enzima a pH 3.5 e del 59% con 2,5 mU/ml di enzima, che si completa in entrambi i casi dopo circa 2 ore (Fig. 4.32). In presenza di mediatore 0,5 mM ho invece, dopo 1 ora, una decolorazione del 60% con 10mU/ml di enzima e del 41% con 2,5 mU/ml a pH 4.0, che raggiunge circa il 70% dopo 2 ore sempre in entrambi i casi. Con mediatore 0,1 mM la decolorazione dopo due ore è del 37% a pH 4.0-4.5. Possiamo concludere che, a basse concentrazioni di colorante (0,02 mg/ml), l'aumento della sola concentrazione di enzima non determina significativi aumenti della decolorazione, mentre il fattore più importante è la concentrazione di mediatore.

**Lcc1
10 mU/ml**



**Lcc1
5 mU/ml**



**Lcc1
2,5 mU/ml**

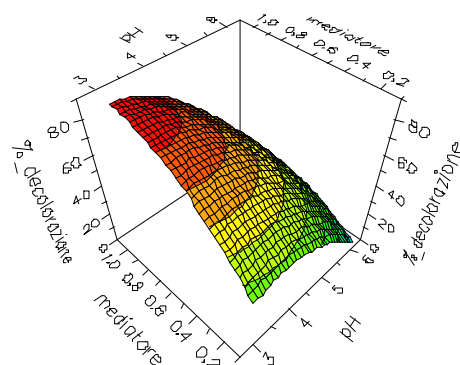
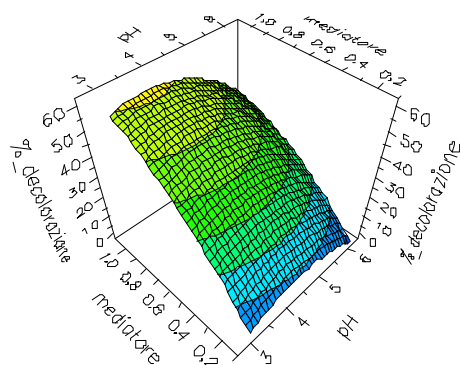


Figura 4.32 - Superfici di risposta mediatore/pH a 1 e 2 ore alla concentrazione di amaranto 0,02 mg/ml.

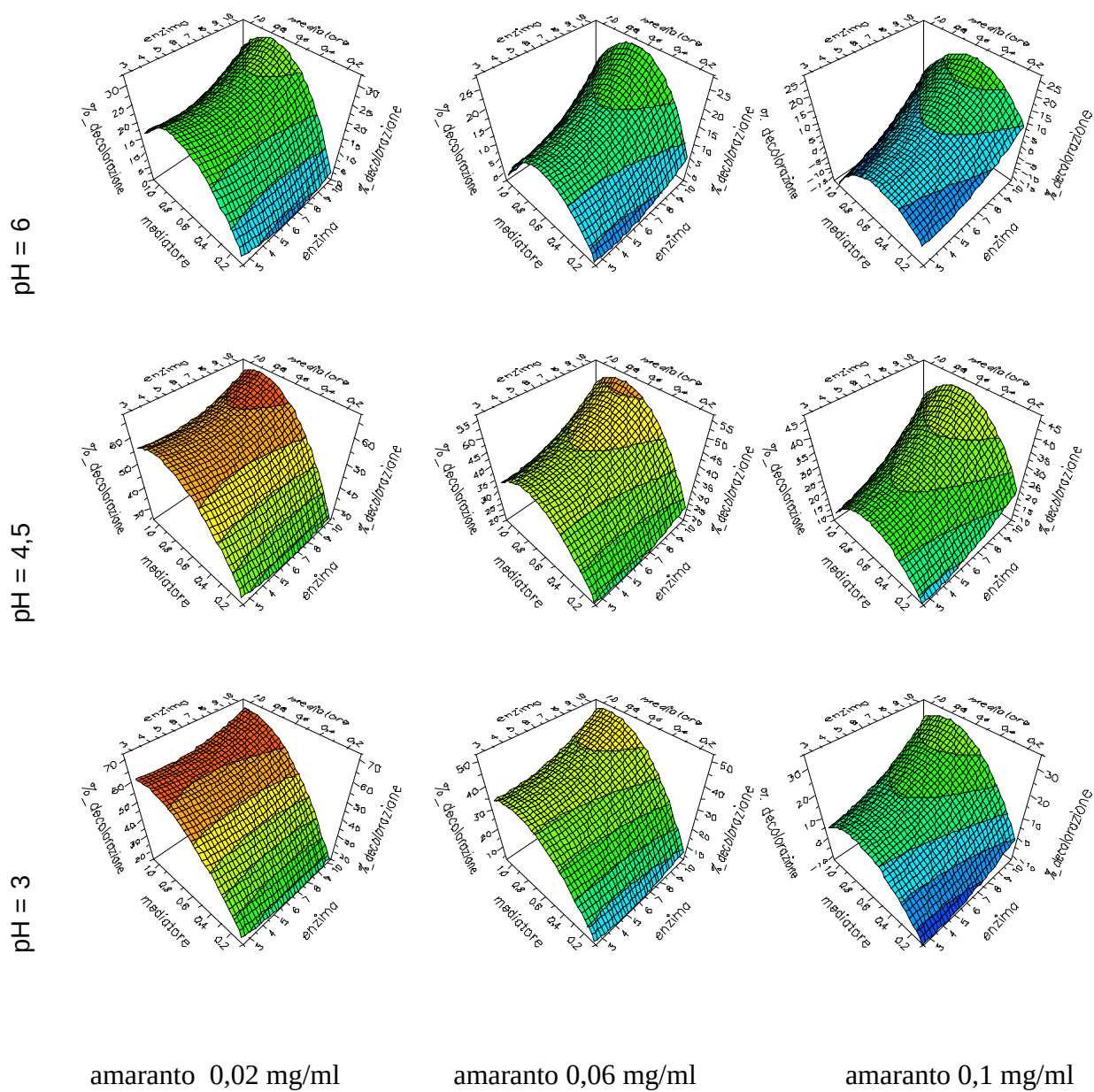
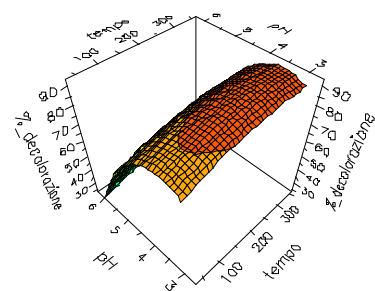
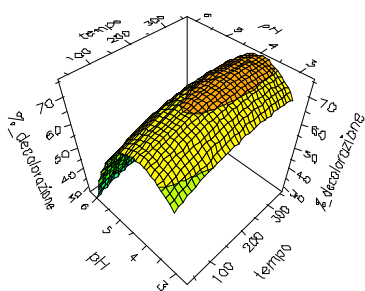
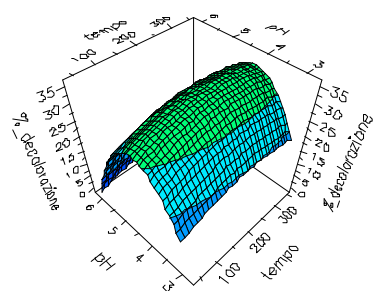
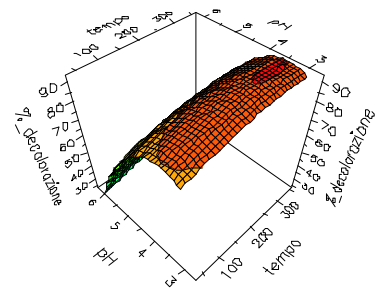
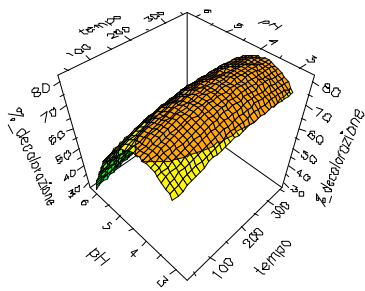
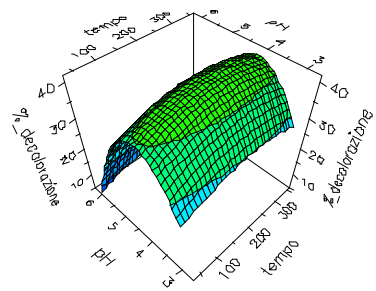


Figura 4.33 - Superfici di risposta mediatore/enzima dopo 2 ore alla concentrazione di amaranto di 0,02 mg/ml.

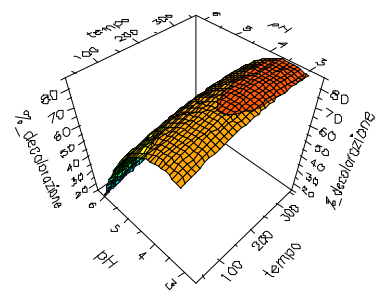
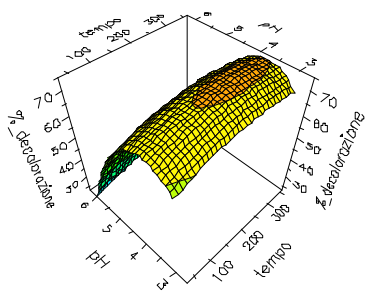
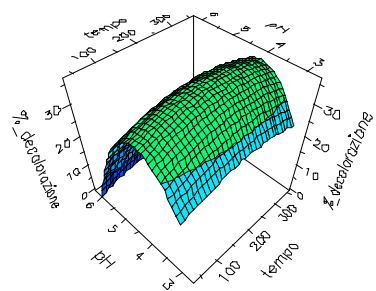
enzima = 10



enzima = 5



enzima = 2,5



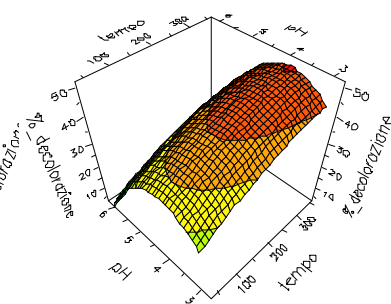
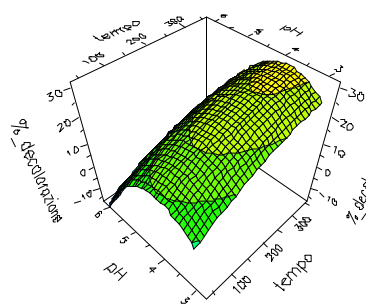
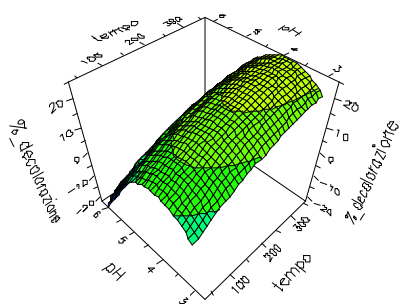
Mediatore VA 0,1 mM

Mediatore VA 0,55 mM

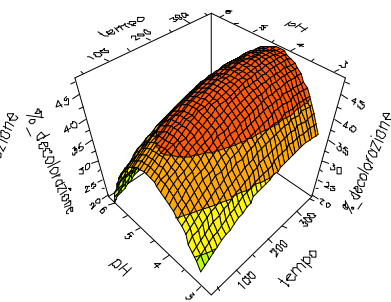
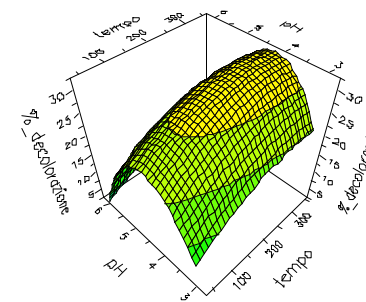
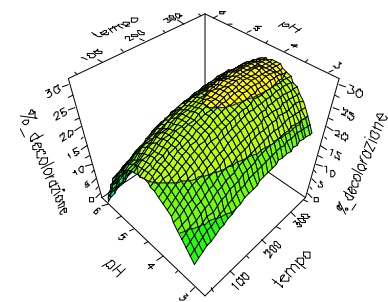
Mediatore VA 1 mM

Figura 4.34 - Superfici di risposta pH/tempo alla concentrazione di amaranto di 0,02 mg/ml dopo due ore.

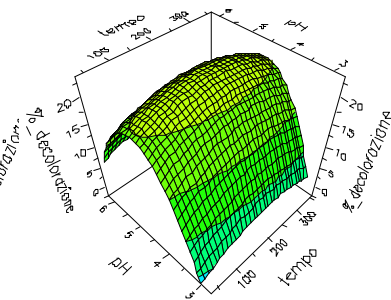
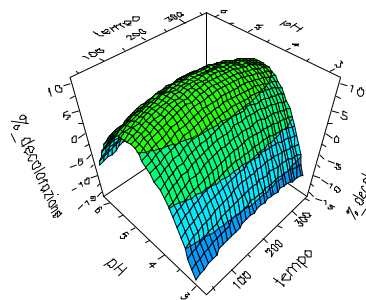
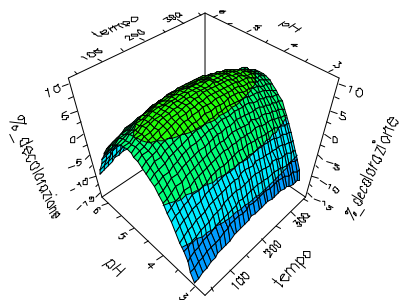
mediatore = 1



mediatore = 0,55



mediatore = 0,1



Lcc1 2,5 mU/ml

Lcc1 5mU/ml

Lcc1 10 mU/ml

Figura 4.35 - Superfici di risposta pH/tempo alla massima concentrazione di amaranto utilizzata 0,1 mg/ml dopo due ore.

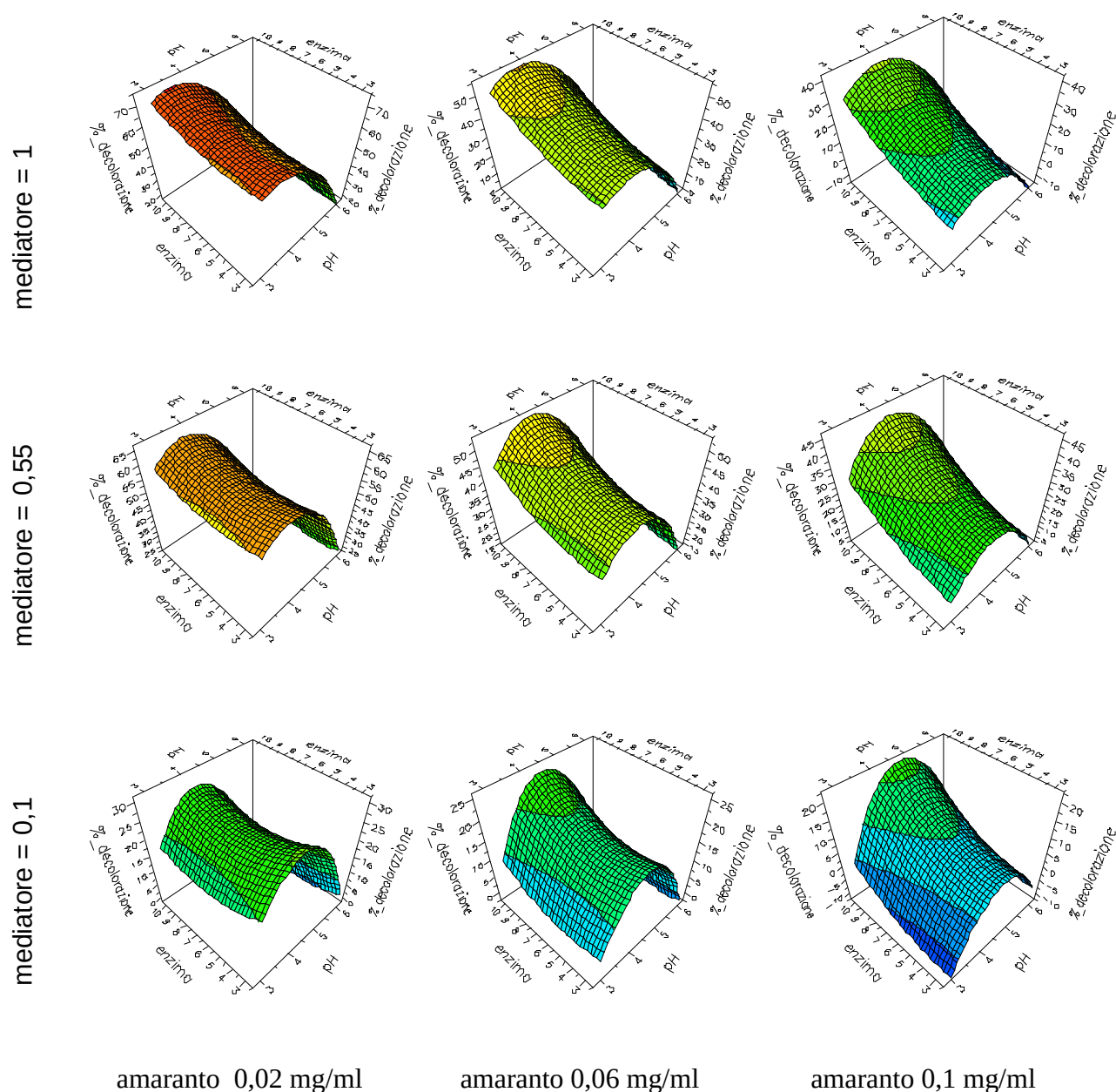


Figura 4.36 - Superfici di risposta enzima/pH a 2 ore alla concentrazione di amaranto 0,02 mg/ml dopo due ore.

E' possibile generare superfici di risposta per ogni combinazione di variabili (alcune sono riportate nelle figure 4.32, 4.33, 4.34, 4.35, 4.36), che ci permettono di analizzare diversi aspetti. In figura 4.36 possiamo vedere come il pH ottimale può variare a seconda delle condizioni. In particolare la diminuzione della concentrazione di acido violurico determina uno spostamento del pH ottimale come mostra l'incurvamento delle superfici verso i valori di pH meno acidi. Anche all'aumentare della concentrazione di amaranto il pH ottimale si sposta verso valori meno acidi come mostra lo spostamento della sella.

Alle concentrazioni elevate di mediatore il pH ottimale è più acido, mentre a concentrazioni più basse si sposta verso valori meno acidi. (Fig. 4.37). E' da notare però che a pH acidi la stabilità dell'enzima è minore, infatti anche se la decolorazione procede più rapidamente nelle prime ore, l'enzima perde quasi il 40% dell'attività dopo 2 ore che arriva al 60% quando nella miscela di reazione è presente anche il mediatore, mentre è ancora completamente attivo a pH 6.0, con una attività residua compresa tra 70 e 80% di quella iniziale dopo 24 ore (Fig. 4.38). L'aggiunta di altro enzima determina infatti, la ripresa delle decolorazione. In figura 4.39 sono mostrati due andamenti di decolorazione in diverse condizioni ma entrambe a pH 3.0, dove possiamo vedere proprio come dopo due ore si raggiunge un plateau. Ma l'aggiunta di altro enzima determina la ripresa della decolorazione .

L'applicazione del sistema RSM consente di effettuare scelte razionali delle condizioni operative a seconda della necessità; ad esempio per il colorante amaranto, si può operare al pH ottimale della laccasi (3.5) in presenza di mediatore 1 mM, ottenendo una decolorazione completa in circa due ore anche con piccole quantità di enzima che però perde abbastanza rapidamente attività e andrebbe riaggiunto a step. Oppure si può operare con quantità più basse di mediatore e pH meno acido (AV 0,7 mM e pH 4.5) su colorante anche molto concentrato (0,06-0,1 mg/ml), ottenendo comunque una buona decolorazione (circa il 55% dopo due ore). In questo caso il fattore limitante sarà il tempo, infatti a tempi più lunghi si otterrà comunque la completa decolorazione.

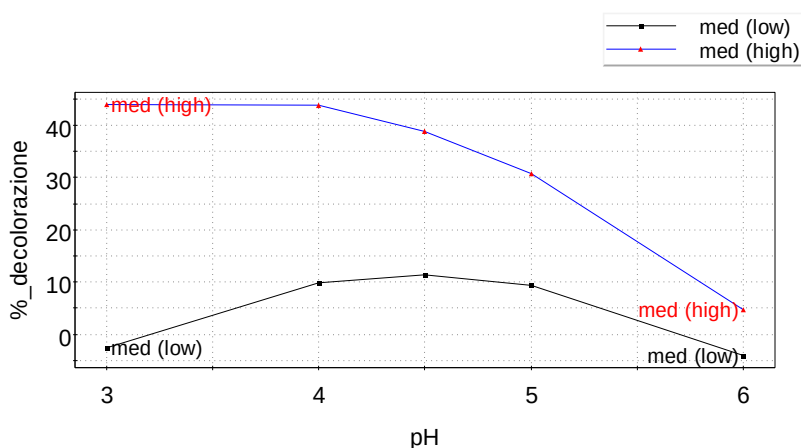


Figura 4.37 - Relazione tra concentrazione di mediatore e pH per il colorante amaranto

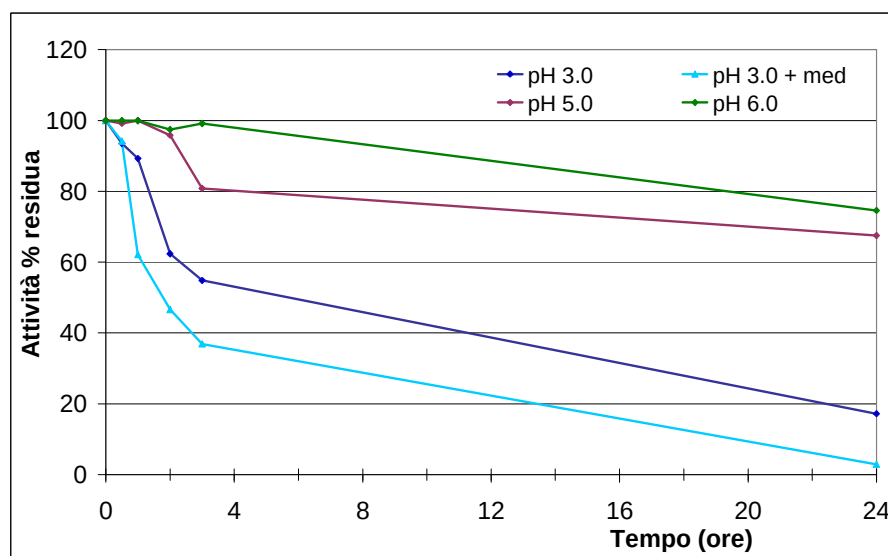


Figura 4.38 – Prove di stabilità dell'enzima Lcc1 a diversi valori di pH

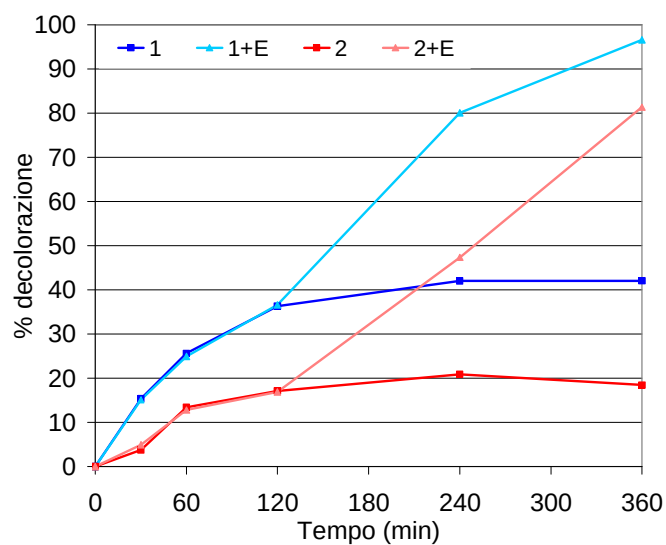


Figura 4.39 - Andamento di due prove di decolorazione in diverse condizioni (prova 1: 0,02 mg/ml amaranto, 0,7 mM VA, 2,5 mU/ml Lcc1; prova 2: 0,02 mg/ml amaranto, 0,1 mM VA, 10 mU/ml Lcc1) ma entrambe a a pH 3.0; l'aggiunta di enzima a 2 e 4 ore determina la ripresa della decolorazione

4.2.4.2 Ottimizzazione per il colorante remazol brilliant blue R

Il Remazol Brilliant Blue R appartiene alla famiglia degli antrachinonici che insieme a quella degli azo sono tra i più importanti coloranti usati nell'industria tessile ed è utilizzato frequentemente come prodotto base nella produzione di altri coloranti polimerici. Il Remazol Brilliant Blue R è un derivato dell'antracene e rappresenta una categoria importante di composti tossici e recalcitranti.

Per il colorante remazol brilliant blue R il metodo RSM è stato applicato per ottimizzare 4 variabili: concentrazione di colorante (0,1 - 0,5 mg/ml), concentrazione di enzima (2,5-10 mU/ml), pH (3-6) e tempo (0-360 min).

La significatività statistica del modello è stata analizzata sempre tramite l'analisi della varianza (ANOVA). Il modello presenta un alto coefficiente di correlazione R^2 (0,945), e un alto potere predittivo indicato dal valore di Q^2 (0,797) (Fig. 4.40). Nella tabella ANOVA sono riportati ancora i valori di Q^2 e R^2 , e i parametri, DF (gradi di libertà), SS (somma dei quadrati), MS (media quadratica), il p-value e l'F-value. Il p-value inferiore a 0,05 indica che i coefficienti di regressione e le interazioni tra ogni variabile indipendente possono essere considerati statisticamente significativi con un intervallo di confidenza del 95% (Tab. 4.6).

Nel *lack of fit plot* (Fig. 4.41) la terza barra più alta della prima indica un buon modello, con un lack of fit statisticamente non significativo (0,079) riportato nella tabella ANOVA.

Il *Normal Probability Plot* mostra che i valori sono normalmente distribuiti lungo una retta e non sono presenti valori errati (Fig. 4.42).

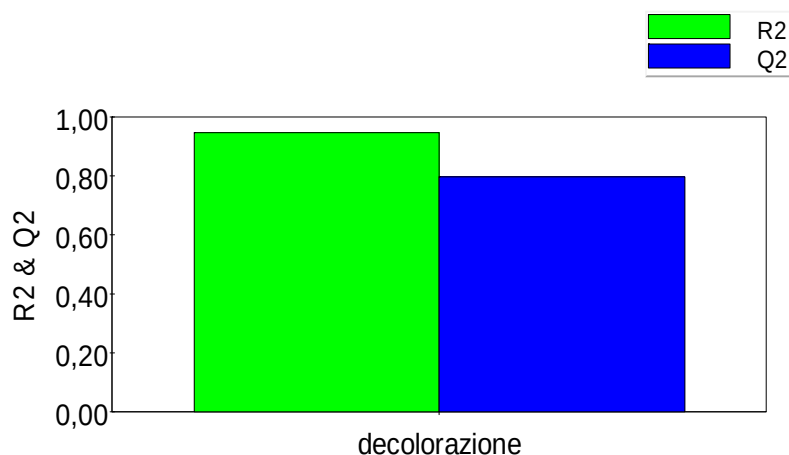


Figura 4.40 - *Summary of fit plot*, riporta i valori di R^2 e Q^2 per il colorante remazol brilliant blue R.

Tabella 4.6 – Analisi della varianza (ANOVA) per il colorante remazol brilliant blue R.

decolorazione	DF	SS	MS	F	p	SD
			(variance)			
Total	30	12935,3	431,178			
Constant	1	5472,36	5472,36			
Total Corrected	29	7462,98	257,344			16,0419
Regression	14	7055,24	503,946	18,5395	0,000	22,4487
Residual	15	407,735	27,1823			5,21367
Lack of Fit (Model Error)	14	407,439	29,1028	98,1706	0,079	5,3947
Pure Error (Replicate Error)	1	0,296451	0,296451			0,544473
N = 30	Q2 = 0,797	Cond. no. = 7,3773				
DF = 15	R2 = 0,945	Y-miss = 0				
	R2 Adj. = 0,894	RSD = 5,2137				

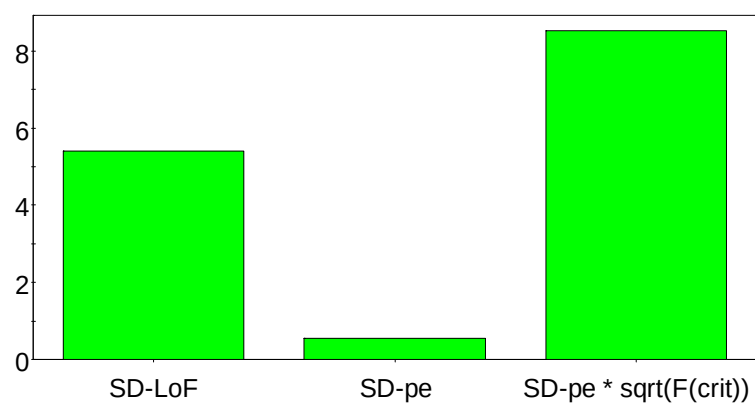


Figura 4.41 – *Lack of fit plot* per il colorante remazol brilliant blue R.

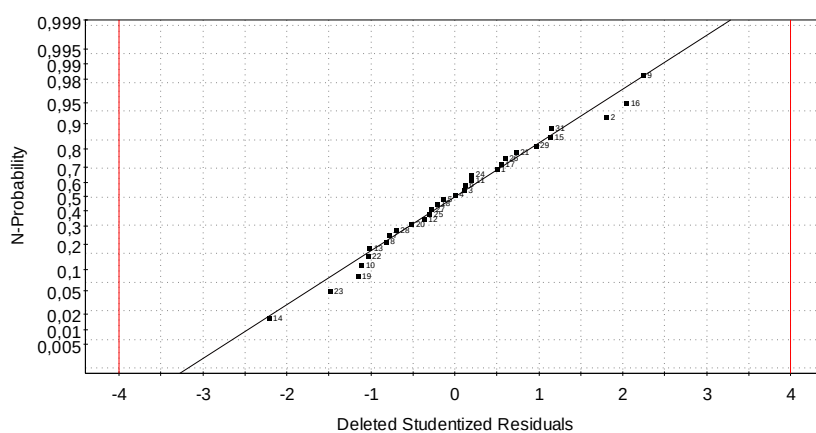


Figura 4.42 - *Normal Probability Plot* per il colorante remazol brilliant blue R.

Alcuni autori (Soares et al., 2001; Nagai et al., 2002) hanno riportato che il remazol brilliant blue R è decolorato soltanto in presenza di mediatori redox. La laccasi Lcc1 di *T. trogii* degrada in modo abbastanza efficiente il colorante remazol brilliant blue R in assenza di mediatori.

L'analisi RSM indica che le condizioni ottimali (60% di decolorazione) sono pH 3.0-3.5, tempi lunghi (240-360 min), enzima 10 mU/ml e colorante 0,1 mg/ml. E' però possibile aumentare la concentrazione di colorante fino a 0,5 mg/ml senza abbassare troppo la percentuale di decolorazione (46%) (Fig. 4.43).

Anche in questo caso in presenza di AV 0,5 mM si ottiene una decolorazione completa in poche ore.

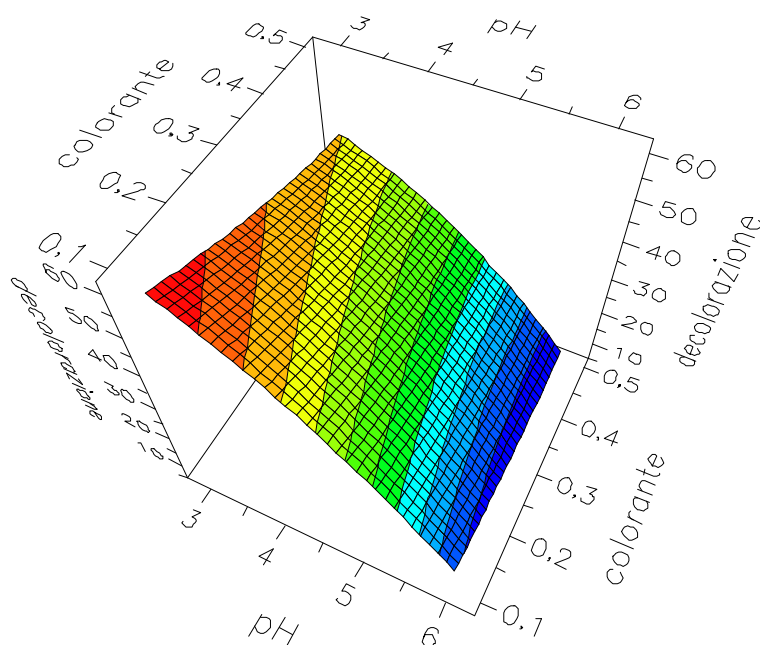


Figura 4.43 - Superficie di risposta colorante/pH con 10 mU/ml di enzima Lcc1 a 360 min per il colorante remazol brilliant blue R.

5 - CONCLUSIONI

Durante questo lavoro di tesi sono stati raggiunti diversi obiettivi:

- Si è proceduto a parziale purificazione e caratterizzazione di isoforme laccasiche secondarie prodotte dal fungo basidiomicete *Trametes trogii*.

Le curve di attività in funzione del pH, costruite nell'intervallo compreso tra 3.0 e 7.5 con tre diversi substrati, hanno messo in evidenza che l'andamento dell'attività è fortemente influenzato dal tipo di substrato utilizzato. Infatti, con il substrato non fenolico, ABTS, le curve di attività/pH per le laccasi Lcc1, P5 e P6 non presentano differenze rilevanti e la massima attività si riscontra al pH più acido analizzato. Con i due substrati fenolici, le isoforme Lcc1 e P5 mostrano un pH ottimale di 3.5 per il 2,6-dimetossifenolo e 4.0 per il guaiacolo, mentre P6 mostra degli spostamenti del massimo di attività verso la neutralità di 0,5 e 1 unità di pH, rispettivamente. L'isoenzima P6 potrebbe essere quindi interessante per applicazioni in campi in cui sono necessarie condizioni di reazione non particolarmente acide.

- Il nuovo gene per laccasi, *lcc2*, è stato isolato da *T. trogii*, espresso con successo nel lievito *P. pastoris* e la proteina ricombinante è stata caratterizzata.

La proteina prodotta dal gene *lcc2* mostra un alto grado di somiglianza con le sequenze amminoacidiche di altre laccasi di basidiomiceti e non corrisponde ad alcuna delle laccasi di *T. trogii* finora caratterizzate. L'analisi filogenetica sviluppata sull'allineamento di sequenza con la nostra proteina ha indicato che Lcc2 di *T. trogii* raggruppa insieme a Lac2 da *Trametes C30*, mentre Lcc1, l'isoforma principale di *T. trogii*, ha formato un ramo indipendente. I due geni delle laccasi di *T. trogii* sono apparentemente paraloghi e, come suggerito per altre laccasi (Makela et al., 2006), potrebbero essersi evoluti da eventi di duplicazione e divergenza, come riflettono anche le differenti proprietà biochimiche. Infatti, Lcc2 ha un comportamento interessante nei confronti dei substrati aromatici, mostrando un pH ottimale più vicino alla neutralità rispetto a Lcc1. I dati ottenuti indicano che Lcc2 presenta un pH ottimale di 5.0 nei confronti dei substrati fenolici un valore meno acido rispetto a quello della maggior parte delle altre fenolossidasi precedentemente caratterizzate; in particolare con i substrati DMP e guaiacolo si osserva uno spostamento di 1 e 2 unità verso la neutralità rispetto a Lcc1. Ma soprattutto è

interessante notare che l'intero profilo attività/pH di Lcc2 con i substrati fenolici è spostato verso i valori meno acidi, di modo che l'enzima conserva circa il 40% della sua attività a pH 6.0 e questo spostamento, a differenza di quanto accade per i mutanti, non coincide con una diminuzione nell'attività specifica. All'optimum di pH, Lcc2 mostra una più alta affinità verso i substrati fenolici (come indicano i valori più bassi di K_M), rispetto a Lcc1, ma il rendimento (k_{cat}/K_M) rimane dello stesso ordine di grandezza di quella di Lcc1, poiché questo aumento è compensato dalla diminuzione generale nella cinetica del trasferimento degli elettroni (diminuzione di k_{cat}) di Lcc2. Per stabilire una relazione tra la struttura e la funzione di questa proteina ne è stata determinata la struttura tridimensionale, tramite modeling comparativo sulla base delle coordinate tridimensionali della laccasi omologa di *T.trogii* Lcc1. Lcc2 mostra una cavità del substrato molto simile a quelle di altre laccasi con i due residui dell'acido aspartico e dell'istidina altamente conservati. La principale differenza riguarda due residui spazialmente vicini che circondano la cavità del substrato: due residui polari, Thr 164 e Ser 264 di Lcc1 sono sostituiti da due residui idrofobici Phe 163 e Ile 265 in Lcc2. Questa variazione influenza la capacità di Lcc2 di interagire con i ligandi. L'efficienza catalitica di Lcc2 verso i ligandi ingombranti che trasportano gruppi polari (per esempio ABTS) diminuisce significativamente, sia a causa di un aumento della K_M che alla diminuzione della k_{cat} indicando una concomitante diminuzione nell'affinità per il substrato e nella cinetica di trasferimento dell'elettrone. Per contro, l'efficienza catalitica di Lcc2 verso i piccoli substrati idrofobici (per esempio guaiacolo e DMP) mostra una diminuzione moderata rispetto a Lcc1, dovuta principalmente a un aumento di circa 5 volte nell'affinità per i substrati. L'aumento nell'affinità di Lcc2, rispetto a Lcc1, verso i ligandi idrofobici che sono all'interno della cavità del substrato potrebbe essere dovuto a un movimento indotto di chiusura della cavità principale dovuto ai residui amminoacidici idrofobici che si trovano sul bordo della cavità. La diminuzione di k_{cat} osservata in Lcc2, rispetto a Lcc1, indica che il trasferimento dell'elettrone dal substrato al rame T1 (lo step che limita la velocità di reazione nella cinetica della laccasi), deve essere influenzato dalle differenze strutturali che esistono fra le due isoforme di laccasi; tuttavia, non può escludersi che siano stati influenzati anche il trasferimento interno dell'elettrone dal rame T1 al centro trinucleare T2T3 e poi alla molecola di ossigeno, e il rilascio del prodotto. L'aumento significativo di inibizione, da parte degli alogenuri ingombranti, quali cloruro e bromuro, dell'attività di Lcc2 rispetto a Lcc1, potrebbe essere attribuita all'alterazione strutturale del canale che collega il sito trinucleare al solvente ed è coinvolto nell'ingresso dell'ossigeno e nel rilascio del prodotto. La proteina ricombinante Lcc2 presenta

caratteristiche catalitiche interessanti e diverse da Lcc1 che la rendono particolarmente interessante dal punto di vista applicativo, come ad esempio nella decolorazione di reflui dell'industria tessile che presentano generalmente un pH alcalino.

➤ Sono stati prodotti e caratterizzati mutanti del gene *lcc1*.

Analisi strutturali di molte laccasi fungine e dei residui amminoacidici che circondano il sito attivo della laccasi Lcc1 di *T. trogii* (Matera et al., 2008) hanno permesso di individuare amminoacidi altamente conservati, il che lascia presupporre un loro importante ruolo nella struttura e nella funzione dell'enzima. Il un residuo di acido aspartico, impegnato in un legame idrogeno con l'ossidril di substrati fenolici, sembra possa influenzare la dipendenza dell'attività dal pH. Questo residuo (Asp 205 di Lcc1) è stato sostituito con amminoacidi con differenti proprietà chimiche: serina (D205S) e cisteina (D205C), residui polari non carichi e lisina (D205K) carica positivamente. I mutanti sono stati espressi in *P. pastoris* e le proteine corrispondenti sono state parzialmente purificate e caratterizzate. Già durante la purificazione i mutanti mostrano un profilo di eluizione diverso da Lcc1, e anche il gel in condizioni native mostra, come ci aspettavamo, una ridotta mobilità elettroforetica delle mutanti rispetto alla wt, che può essere attribuita all'assenza della carica negativa del residuo Asp205. Questi risultati indicano che il residuo dell'aspartato presente all'interno del sito attivo rimane accessibile al solvente. I profili attività/pH indicano che il residuo amminoacidico Asp205 è particolarmente importante per la funzionalità delle laccasi. La sostituzione dell'Asp205 con amminoacidi polari non carichi o carichi positivamente determina uno spostamento dei valori di pH ottimali verso la neutralità con i substrati fenolici. In particolare è stato osservato, nell'optimum di pH per il DMP, uno spostamento verso valori di pH più alti di circa 1.0 unità per tutti e tre i mutanti D205C, D205S e D205K. Con il substrato guaiacolo, l'optimum di pH mostra uno shift di 0.5 unità di pH per i mutanti D205S e D205C, mentre nessuna differenza è stata determinata per il mutante D205K. E' però importante notare che l'attività specifica dei mutanti analizzati è significativamente più bassa di quella della wild type e che lo spostamento del massimo di pH verso valori meno acidi potrebbe essere associato a una maggiore riduzione dell'attività a pH acidi. Infatti, la presenza di un amminoacido carico negativamente nella tasca che lega il substrato potrebbe stabilizzare il radicale catione che si forma durante il meccanismo catalitico e la sua assenza potrebbe determinare una diminuzione significativa dell'attività specifica degli enzimi mutati.

I valori delle costanti cinetiche determinati in funzione del pH confermano che la sostituzione dell'Asp205 con amminoacidi polari non carichi o carichi positivamente determina uno spostamento dei valori di pH ottimali verso la neutralità e che questo residuo amminoacidico risulta particolarmente importante per l'attività specifica delle laccasi.

- E' stata verificata la capacità degradativa su composti fenolici e coloranti della laccasi Lcc1.

Le prove di degradazione su composti fenolici con la laccasi Lcc1 immobilizzata hanno permesso di determinare che il sistema di degradazione più efficiente è quello in batch in cui la resina con la proteina immobilizzata è a diretto contatto con la miscela da degradare e sotto continua agitazione. Questo sistema applicato anche a tre coloranti ci ha permesso di valutare positivamente la capacità degradativa della laccasi che è stata quindi provata su un numero maggiore di coloranti appartenenti a diverse classi strutturali azoici (amaranto, carmoisina, new coccine, sunset yellow), antrachinonici (remazol brilliant blue R), triarilmetano (patent blue) e indigoidi (indigo), tramite la tecnica spettroscopica in microtiter che permette di effettuare molte prove contemporaneamente. Le prove in microtiter ci hanno permesso di confrontare laccasi ricombinanti provenienti da diversi ospiti, riscontrando delle differenze nell'attività tra la forma nativa e le ricombinanti che potrebbero essere dovute a una diversa glicosilazione e/o da un diverso folding della proteina, dovuti all'espressione eterologa. Inoltre ci hanno fornito dei dati preliminari sulle principali variabili che influenzano il processo di decolorazione.

- Sono state ottimizzate le condizioni sperimentali per la decolorazione da parte di Lcc1 sui coloranti amaranto e remazol brilliant blue R tramite RSM.

L'analisi RSM ci ha consentito di analizzare diverse variabili contemporaneamente, e ci ha permesso di ottimizzare il processo di decolorazione da parte di Lcc1 per due coloranti appartenenti alle due principali classi utilizzate dall'industria tessile mostrando che, in opportune condizioni, è possibile operare a pH più vicini alla neutralità.

6 - BIBLIOGRAFIA

- **Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K.H., Cavaco-Paulo A. Gubitz GM.** (2000). Decolourization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3357-3362.
- **Agematu H., Tsuchida T., Kominato K., Shibamoto N., Yoshioka T., Nishida and H.** (1993). Enzymatic dimerization of penicillin. *J. Antibiot.* 46, 141-148.
- **Aharoni A., Gaidukov L., Yagur S., Toker L., Silman I., Tawfik D.S.** (2004). Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 482-487.
- **Alam M.D.Z., Mansor F.M. and Jalal K.C.A.** (2008). Optimization of decolorization of methylene blue by lignin peroxidase enzyme produced from sewage sludge with *Phanerocheate chrysosporium*. *Journal. of Hazardous Materials* article in press.
- **Alfani F., Ercole C., Lepidi A., Cantarella M., Filippi C. and Schiesser A.** (1990). Biological free treatment of wheat straw: physical mechanical and enzymatic evaluation of process effectiveness. In: Grassi G., Gosse G., dos Santos G (eds) *Biomass for energy and industry, vol 2. Conversion and utilization of biomass. 5th E.C. Conference of Biomass*, Elsevier, Amsterdam, 2203-2210.
- **Andreasson L.E. and Reinhammar B.** (1976). Kinetic studies of *Rhus vernicifera* laccase. Role of the metal centers in electron transfer. *Biochim. Biophys. Acta*, 445, 579-597.
- **Antorini M., Herpoel-Gimbert I., Choinowski T., Sigoillot J.-C., Asther M., Winterhalter K., and Piontek K.** (2002). Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. *Biochim. Biophys. Acta* 1594, 109-114.
- **Aplin R. and Waite T.** Comparison of three advanced oxidation processes for degradation of textile dyes. *Water Science and Technology* 2000 42, 345-354.
- **Archibald F.S., Bourbonnais R., Jurasek L., Paice M.G. and Reid I.D.** (1997). Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal. of Biotechnology*, vol. 53, no. 2-3, 215-236.
- **Arslan-Alaton I., Akmehmet-Balciglu I. and Bahnemann D.W.** (2002). Advanced oxidation of a reactive dyebath effluent: comparison of O₃, H₂O₂/UV-C and TiO₂/UV-A processes. *Water. Research.* 36, 1143-1154.
- **Baldrian P.** (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 215-242.

- **Banci L., Ciofi-Baffoni S. and Tien M.** (1999). Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers. *Biochemistry* 38, 3205-3210.
- **Bar-Nun N. and Mayer, A.M.** (1990) Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 29 (3), pp. 787-791.
- **Bauer C.G., Kuehn A., Gajovic N., Skorobogatko O., Holt P.J., Bruce N.C., Makower A., Lowe C.R. and Scheller F.W.** (1999). New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 364,179-183.
- **Bayer A. and Drewson V.** (1882). *V. Ber. Dtsch. Chem. Ges.*15, 2856.
- **Bertrand T., Jolivald C., Briozzo P., Caminade E., Joly N., Madzak C., and Mouglin C.** (2002) Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 41, 7325-7333.
- **Bhatt M., Patel M., Rawal B., Novotný Č., Molitoris H. P. and Šašek V.** (2000). Biological decolorization of the synthetic dye RBBR in contaminated soil. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16, 195-198.
- **Birnboim H.C.**(1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Method. of Enzymology* 100, 243-255.
- **Blumer M.** Polycyclic aromatic compounds in nature. *Scientific American* 234, 35-45.
- **Bourbonnais R., Leech D. and Paice M.G.** (1998). Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochim. Biophys Acta-General Subjects* 1379, 381–390.
- **Box G.E.P. and Wilson K.N.** (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.* 13, 1-45.
- **Bradford M.** (1976) - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- **Brenna O. and Bianchi E.** (1994). Immobilized laccase for phenolic removal in must and wine. *Biotec. Lett.* 16, 35-40.
- **Brocca S.** (2004). L'evoluzione diretta e i nuovi metodi di screening e selezione. *Prometeus Anbi Magazine*.
- **Bulter T., Alcade M., Sieber V., Meinhold P., Schlachtbauer C. and Arnold F.H.** (2003). Functional Expression of a Fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by Directed Evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 987-995.
- **Call H.P. and Mücke I.** (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym-process). *J. Biotechnol.* 53,163-202.

- **Cárdenas W. and Dankert J.R.** (2000) Cresolase, catecholase and laccase activities in haemocytes of the red swamp crayfish. *Fish & Shellfish Immunology* 10, 33–46.
- **Cassland P. and Jönsson L.J.** (1999). Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67(3), 1163-1170.
- **Chang, I.P., Chen M.T. and Lin S.S.** (2003). Wet air oxidation of a reactive dye solution using CoAlPO₄-5 and CeO₂ catalysts. *Chemosphere* 52, 943–949.
- **Chivukula M. and Renganathan V.** (1995). Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61,4374-4377.
- **Claus H. and Filip Z.** (1997). The evidence of a laccase-like activity in a *Bacillus sphaericus* strain. *Microbiol. Res.* 152, 209–215.
- **Clutterbuck A.J.** (1972). Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* 70 (3), 423-435.
- **Cohen R., Persky L. and Hadar Y.** (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 582–594.
- **Colao M.C., Ruzzi M., Lupino S., Buonocore V. and Garzillo A.M.V.** (2006). “Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme” *Microbial Cell Factories*, 5, 31.
- **Colao M.C., Garzillo A.M., Buonocore V., Schiesser A., and Ruzzi M.** (2003). Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the basidiomycete *Trametes trogii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 153-158.
- **Collins P.J., and Dobson A.D.W.** (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3444-3450.
- **Crestini C., Jurasek L. and Argyropoulos D.S.** (2003). On the mechanism of the laccase-mediator system in the oxidation of lignin. *Chemistry* 9, 5371–5378.
- **Cripps C., Bumpus J.A. and Aust S.D.** (1990). Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1114-1118.
- **D’Acunzo F., Galli C. and Masci B.** (2002). Oxidation of phenols by laccase-mediator systems. *Eur. J. Biochem.* 269 (12), 5330–5335.
- **D’Souza T.M., Merritt C.S. and Reddy C.A.** (1999) Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5307–5313.
- **Daneshvar N., Sorkhabi H.A. and Tizpar A.** (2003). Decolorization of orange II by electrocoagulation method. *Sep. Purif. Technol.* 31, 153–162.

- **De Vries O.M.H., Kooistra W.H.C.F. and Wessels J.G.H.** (1986). Formation of an extracellular laccase by a *Schizophyllum commune* dikaryon. *Journal of General Microbiology* 132 (10), 2817-2826.
- **Dedeyan B., Klonowska A., Tagger S., Tron T., Iacazio G, Gil G. and Le Petit J.** (2000). Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 925–929.
- **Delee W., O’Niell C., Hawkcs F.R. and Pinheiro H.M.** (1998). Anaerobic treatment of textile effluents: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 73, 323–325.
- **Diamantidis G., Effose A., Potier P. and Bally R.** (1998). - Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biol. Biochem.* 32, 919-927.
- **Dittmer J.K., Patel N.J., Dhawale W.S. and Dhawale S.S.** (1997). Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. *FEMES Microbiol. Lett.* 147, 65-70.
- **Dittmer N.T., Suderman R. J., Jiang H., Zhu Y. C., Gorman M. J. and Kramer K. J.** (2004). Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 34, 29–41.
- **Draper N.R., John J.A.** (1988). Response-surface designs for quantitative and qualitative variables. *Technometrics* 30, 423–428.
- **Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S., Ostergaard P., Schneider P., Svendsen A. and Davies G.J.** (2001). Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different "type 2 Cu-depleted" isoforms. *Acta Cryst. D57*, 333-336.
- **Duran N. and Duran M.** (2000). Enzyme applications in the textile industry. *Review of Progress in Coloration and Related Topics* 30, 41-44.
- **Durrens P.** (1981). The phenol oxidases of the ascomycete *Podospora anserina*: the three forms of the major laccase activity. *Arch. Microbiol.*, 130, 121-124.
- **Eggert C., Temp U., Dean J.F.D. and Erikson K.E.L.** (1996). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS letters* 39,: 144-148.
- **Enguita F.J., Marcal D., Martins L.O., Grenha R., Henriques A.O., Lindley P.F. and Carrondo M.A.** (2004). Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 279, 23472-23476.
- **Fabbrini M., Galli C. and Gentili P.** (2002a). Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 16, 231–240.

- **Fabbrini M., Galli. C. and Gentili P.** (2002b) Radical or electrontransfer mechanism of oxidation with some laccase/mediator systems. *J. Mol. Catal. B: Enzym* 18, 169–171.
- **Fernanda M.M., Tamara A.G., Raquel C. And Aldo J.P.D.** (2007). Decolourisation of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* Doi10.1007/s11274-007-9621-2.
- **Fileciti P., Junakovic N. and Ballario P.** (1985). Rapid alkaline preparation for yeast circular covalently closed DNA molecules. *Curr. Genet.*, 9, 123-126.
- **Galhaup C. and Haltrich D.** (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, pp. 225–232.
- **Garavaglia, S., Cambria, M.T., Miglio, M., Ragusa, S., Iacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, V. and Rizzi, M.** (2004). The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J. Mol. Biol.* 342, 1519-1531.
- **García O, Camarero S, Colom JF, Martíñez _AT, Martíñez MJ, Monje R** (2003). Optimization of a laccase mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57, 513-519.
- **Garzillo A.M., Colao M.C., Caruso C., Caporale C., Celletti D. and Buonocore, V.** (1998). Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 545-551.
- **Gellissen G. and Hollenberg P.C.** (1997). Applications of yeasts in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* : a review. *Gene* 190, 87-97.
- **Gelo-Pujic M., Hyug-Han K., Bultin N.G. and Palmore G.T.R.** (1999). Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*. *App. Environ. Microbiol.*, 65, 5515-5521.
- **Ghindilis A.S., Gavrilova V.P. and Yaropolov A.I.** (1992). Laccase-based biosensor for determination of polyphenols: determination of catechols in tea. *Biosens. Bioelec.* 7, 127–131.
- **Gianfreda L., Xu F. and Bollag J.M.** (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorem. J.* 3. 1-25.
- **Gräbe C. and Liebermann C.** (1868). "Ueber Alizarin und Anthracen". *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 1 (1), 41–56.
- **Gregory R.P. and Bendall D.S.** (1966). The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camella sinensis* L.). *Biochem. J.* 101 , 569–581.
- **Griess P. and Liebig** (1862). *Ann. Chem.* 121, 258.

- **Guex N., and Peitsch M.C.** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- **Haghighi B., Gorton L., Ruzgas T. and Jonsson L. J.** (2003). Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis - *Anal. Chim. Acta*, 487: 3-14.
- **Hakulinen N., Kiiskinen L., Kruus K., Saloheimo M., Paananen A., Koivula A. and Rouvinen J.** (2002). Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nature Struct. Biol.* 9, 601-605
- **Hao O.J., Kim H. and Chaing P.C.** (2000). Decolorization of wastewater. *Cri. Rev. Environ. Sci. Technol.* 30, 449–505.
- **Heinfling A., Martínez M.J., Martínez A.T., Bergbauer M. and Szewzyk, U.** (1998). Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2788–2793.
- **Higgins D.R. and Cregg, J.M.** (1998). Introduction to *Pichia pastoris*. In: *Higgins, D.R. and Cregg, J.M., Editors, 1998. Methods in Molecular Biology: Pichia Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, 1–15.*
- **Hoegger P.J., Kilaru S., James T.Y., Thacker J.R. and Kues U.** (2006) Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal* 273, 2308-2326.
- **Hopkins T.L. and Kramer K.J.** (1992). Insect cuticle sclerotization. - *Annu. Rev. Entomol.* 37, 273-302.
- **Hullo M.F., Moszer I., Danchin A. and Martin-Verstraete I.** (2001) CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol* 183, 5426–5430.
- **Hüttermann A., Mai C. and Kharazipour A.** (2001) Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55 (4), 387-394.
- **Ikeno M. Grimes B. Okazaki T. Nakano M. Saitoh K. Hoshino H. McGill N.I. Cooke H. and Masumoto H.** (1998). Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes.- *Nat Biotechnol* 16: 431-439.
- **Janse B.J.H., Gaskell J., Akhtar M. and Cullen D.** (1998). Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidases, manganese peroxidases and oxidase in wood. *Appl. Env. Microbiol.* 64, 3536-3538.

- **Johannes C. and Majchercsyk A.** (2000b). Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology* 78, 193–199.
- **Johannes C. and Majcherczyk A.** (2000a) - Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 66: 524-528.
- **Jolivalt C., Madzak C., Brault A., Caminade E., Malosse C., Mougin C.** (2005). Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 6, 450-456.
- **Jönsson L.J., Saloheimo M. and Penttilä M.** (1997). Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of lcc1 and expression in *Pichia pastoris*. *Curr. Genet.* 32, 425-430.
- **Kabsch W. and Sander C.** (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577-2637.
- **Kahraman S. and Yesilada O.** (2003). Decolorization and bioremediation of molasses wastewater by white rot fungi in a semi-solid state condition. *Folia Microbiol* 48, 525–528.
- **Kiiskinen L.L., Kruus K., Bailey M., Ylösmäki E., Siika-aho M. and Saloheimo M.** (2004). Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology* 150, 3065-3064.
- **Kiiskinen L.L., Viikari L. and Kruus K.** (2002). Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 198-204.
- **Kim S.H., Kim J.H., Cui J.Z., Gal Y.S., Jin S.H. and Koh K.** (2002). Absorption spectra, aggregation and photofading behaviour of near-infrared absorbing squarylium dyes containing perimidine moiety. *Dyes Pigments* 55, 1–7.
- **Klonowska A., Le Petit J. and Tron T.** (2001). Enhancement of minor laccases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. *FEMS Microbiol.* 200, 25–30.
- **Klonowska A., Gaudin C., Fournel A., Asso M., Le Petit J., Giorgi M. and Tron T.** (2002). Characterization of low redox potential laccase from *Basidiomycete* C30. *European Journal of Biochemistry.* 269, 6119-6125.
- **Koby M., Can O.T. and Bayramoglu M.** (2003). Treatment of textile wastewaters by electrocoagulation using iron and aluminum electrodes, *J. Hazard. Mater. B* 100 (2003) 163–178.
- **Kojima Y., Tsukuda Y., Kawai Y., Tsukamoto A., Sugiura J., Sakaino M. and Kita Y..** (1990). Cloning, sequence analysis, and expression of ligninolytic phenoloxidase genes of the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *J. Biol. Chem.* 265,15224-15230.

- **Koudelka G.B. and Ettinger M.J.** (1988). Fluoride effects on the activity of *Rhus* laccase and the catalytic mechanism under steady-state conditions. *J. Biol. Chem.* 263, 3698-3705.
- **Laemmli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- **Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., and Higgins D.G.** (2007). ClustalW2 and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- **Larsson S., Cassland P. and Jonsson L.J.** (2001). Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1163-1170.
- **Laskowski, R.A., MacArthur M.W., Moss D.S. and Thornton J.M.** (1993). PROCHECK
- A program to check the stereo chemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.
- **Lee H., Song M. And Hwang S.** (2003). Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem.* 38, 1685–1693.
- **Leontievsky A., Myasoedova N., Baskunov B., Golovleva L., Bucke C. and Evans, C.** (2001). Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by free and immobilized fungal laccase. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 57, 85-91.
- **Li K.C., Xu F. and Eriksson K.E.L.** (1999). Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of nonphenolic lignin model compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2654-2660.
- **Liu W., Chao Y., Liu S., Bao H. and Qian S.** (2003) Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fomes lignosus* and expression in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 174-181.
- **Lorenzo M., Moldes D., Rodríguez Couto S. and Sanromán A.** (2002). Improvement in laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*, *Bioresour. Technol.* 82, 109–113.
- **Lui Ang E., Zhao H. and Obbard J. P.** (2005). Recent advances in bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering - *Enzyme and Microbial Technology*, 37, 487-496.
- **Lundbald V.** (1997). The end replication problem: more than one solution. *Nature med.*, 3, 1198-1199.
- **Madzak C., Mimmi M.C., Caminade E., Brault A., Baumberger S., Briozzo P., Mougin C., and Jolival C.** (2006). Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis. *Protein Engin. Des. Selec.* 19, 77-84.

- **Mai C., Majcherzyk A., Hüttermann A.** (2000). Chemo-enzymatic synthesis and characterization of graft copolymers from lignin and acrylic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 167-175.
- **Majcherzyk A. and Johannes C.** (2000). Radical mediated indirect oxidation of a PEG-coupled polycyclic aromatic Hydrocarbon (PAH) model compound by fungal laccase. *Biochimica et biophysica acta* 1474, 157-162.
- **Makela R.M., Hiden K.S., Hakala T.K., Hatakka A., and Lundell T.K.** (2006) Expression and molecular properties of a new laccase of the white rot fungus *Phlebia radiata* grown on wood. *Curr. Genet.* 50, 323-333.
- **Malmström B.G., Reinhammar B. and Vanngard T.** (1968) Two forms of copper (II) in fungal laccase. *Biochim. Biophys. Acta* 156, 67-76.
- **Mandel M. and Higa A.** (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology*, 53, 159-162.
- **Martins L.O., Soares C.M., Pereira M.M., Teixeira M., Costa T., Jones G.H., Henriques A.O.** (2002). Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J. Biol. Chem.* 277, 18849–18859.
- **Matera I., Gullotto A., Tilli S., Ferraroni M., Scozzafava A., and Briganti F.** (2008) Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with *p*-toluate. *Inorg. Chim. Acta* 361, 4129-4137.
- **Mathiasen T.E.** (1995). Laccase and beer storage. *PCT Int. Appl. WO* 9521240 A2.
- **Mayer A.M. and Staples R.C.** (2002) - Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- **McCallum J.E.B., Madison S.A., Alkan S., Depinto R.L. and Wahl R.U.R.** (2000). Analytical studies on the oxidative degradation of the reactive textile dye Uniblue A. *Environmental Science and Technology*, 34, 5157-5164.
- **McMullan G., Meehan C., Conneely A., Kirby N., Robinson T., Nigam P., Banat. I.M., Merchant R. and Smyth W.F.** (2001). Microbial decolorization and degradation of textile dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 81–87.
- **Messerschmidt A. and Huber R.** (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. *Eur J Biochem* 187, 341-352.
- **Meth-Cohn O. and Anthony T.S.** (1995). The Mauveine Mystery. *Chemistry in Britain*, 31.
- **Meyer U.** (1981). Biodegradation of Synthetic Organic Colorants. *Academic Publishers, London*.

- **Moldes D. and Sanroman M.A.** (2006). Amelioration of the ability to decolorize dyes by laccase: relationship between redox mediators and laccase isoenzymes in *Trametes versicolor*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 1197-1204.
- **Moore M.N., Livingstone D.R. and Widdows J.** (1989). Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the aquatic environment. *C.R.C. Press*: 291-328.
- **Muheim A., Fiechter A., Harvey P.J. and Schoemaker H.E.** (1992). On the mechanism of oxidation of non-phenolic lignin model compounds by the laccase – ABTS couple. *Holzforschung* 46, 121–126.
- **Murugesan K.** (2002). Studies on production, purification, characterization and crystallization of laccase from a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* and its application in bioremediation of textile dye effluent and dye contaminated soils. *PhD thesis. Madras University*.
- **Murugesan K., Dhamija A., Nam I.H., Kim Y.M. and Chang Y.S.** (2007). Decolourization of reactive black 5 by laccase: Optimization by response surface methodology. *Dyes and Pigments* 75, 176-184.
- **Myers R.H. and Montgomery D.C.** (2002). Response Surface Methodology. *John Wiley & Sons Inc., USA*, 43.
- **Nagai M., Sato T., Watanabe H., Saito K., Kawata M. and Enei H.** (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolourisation of chemically different dyes. *Appl. Microbiol Biotechnol* 60, 327–335.
- **Nagarajan G. and Annadurai G.** (1999). Biodegradation of reactive dye (Verofix Red) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* using Boxe Behnken experimental design. *Bioprocess Eng* 20, 435-440.
- **Nakamura T.** (1958). Purification and physico-chemical properties of laccase. *Biochim. Biophys. Acta* 30: 44-52.
- **Niku P.M.L. and Viikari L.** (2000). Enzymatic oxidation of alkanes. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic* 10, 435-444.
- **Nyanhongo G.S., Gomes J., Guñbitz G.M., Zvaunya R., Read J. and Steiner W.** (2002). Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Res* 36,1449–1456.
- **Otterbein L., Record E., Longhi S., Ashter M. and Moukha S.** (2000). Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.*, 267, 1619.

- **Pahlman R. and Pelkonen O.** (1987). Mutagenicity studies of different polycyclic aromatic hydrocarbons: the significance of enzymatic factors and molecular structure. *Carcinogenesis* 8, 773-778.
- **Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Fontanella B., and Sannia G.** (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 920-924.
- **Piontek K., Antorini M., and Choinowski T.** (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* 277, 37663-37669.
- **Piscitelli A., Giardina P., Mazzni C. and Sannia G.** (2005). Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2005), 69, 428-439.
- **Potin O., Veignie E. and Rafin C.** (2004). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS. Microbiology Ecology*, 51, 71-78.
- **Potthast A., Rosenau T. and Fischer K.** (2001). Oxidation of benzyl alcohols by the laccase-mediator system (LMS) – a comprehensive kinetic description. *Holzforschung* 55, 47–56.
- **Rai H., Bhattacharya M., Singh J., Bansal T.K., Vats P. and Banerjee, U.C.** (2005). Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 35, 219–238.
- **Ranocha P., McDougall G., Hawkins S., Sterjiades R., Borderies G., Stewart D., Cabanes-Macheteau M., Boudet A.M. and Goffner D.** (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases—a divergent gene family—in poplar. *Eur. J. Biochem.* 259, 485–495.
- **Reife A. and Othmer K.** (1993). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley and Sons Inc. 753–784.
- **Reinhammar B.** (1997). Kinetic studies on polyporus and three laccase in multicopper oxidase. 167-200 Ed. Messerschmidt A. World Scientific Singapore.
- **Reyes R., Pickard M. and Vazquez-Duhalt R.** (1999). Hydroxybenzotriazole increase the range of textile dyes decolourized by immobilized laccase. *Biotechnol Lett* 21, 875-880.
- **Robinson T., McMullan G., Marchant R. and Nigam P.** (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology* 77, 247-255.

- **Robles A., Lucas R., Alvarez de Cienfuegos G. and Galvez A.** (2000) Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enz Microbiol Technol* 26, 484-490.
- **Rodríguez Couto S., Rodríguez A., Paterson R.R.M., Lima N. and Teixeira J.A.** (2006). High laccase activity in a 6 l airlift bioreactor by free cells of *Trametes hirsuta*. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 612-616.
- **Rogalski J., Lundell T., Leonowicz A. and Hatakka A.** (1991). Influence of aromatic compounds and lignin on production of ligninolytic enzyme by *Phlebia radiata*. *Phytochem* , 30, 2869-2872.
- **Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning. *A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- **Sanchez-Amat A and Solano F.** (1997). A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp. shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240 , 787–792.
- **Sato Y., Wuli B., Sederoff R. and Whetten R.** (2001). Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *J Plant Res* 114, 147–155.
- **Schepers A.W., Thibault J. and Lacroix C.** (2003). *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. Multiple factor kinetic analysis. *Enzyme Microb. Tech.* 30, 176–186.
- **Servili M., Destefano G., Piacquadio P. and Sciancalepore V.** (2000). A novel method for removing phenols from grape must. *Am. J. Enol. Vitic.*, 51, 357-361.
- **Seshadri S., Bishop P. L. and Agha A. M.** (1994). Anaerobic/ aerobic treatment of selected azo dyes in wastewater. *Waste Mgmt*, 15, 127-137.
- **Shimizu A., Sasaki T., Kwon J.H., Odaka A., Satoh T., Sakurai N., Sakurai T., Yamaguchi S. and Samejima T.** (1999). Site-directed mutagenesis of a possible type 1 copper ligand of bilirubin oxidase; a Met467Gln mutant shows stellacyanin-like properties. *J. Biochem. Apr*;125(4), 662-668.
- **Smith M., Shnyreva A., Wood D.A. and Thurston C.F.** (1998). Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes *lcc1* and *lcc2* in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology*, 144, 1063-1069.
- **Soares G.M.B., Amorim M.T.P. and Costa-Ferreira M.** (2001). Use of laccase together with redox mediators to decolourize remazol brilliant blue R. *J Biotechnol* 89,123-129.
- **Soden D.M. and Dobson A.D.W.** (2001). Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*,147: 1755-1763.

- **Soden D.M., O'Callaghan J. and Dobson A.D.W.** (2002) Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology* 148, 4003-4014.
- **Soetaert W. and Vandamme E. J.** (2006). The impact of Industrial Biotechnology. *Biotechnology Journal*, 1, 756-769.
- **Stolz A.** (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 69–80.
- **Stutz C.** (1993). The use of enzymes in ultrafiltration. *Fruit Processing* 3: 248-252.
- **Svetlana P. and Kainchang Li** (2003). Investigation of chitosan phenolics systems as wood adhesive. *Journal Biotechnol.* 102, 199-207.
- **Swamy J. and Ramsay J.A.** (1999). The evaluation of white rot fungi in the decolorization of textile dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 130–137.
- **Tavares Ana P.M., Raquel O. Cristóvão, José M. Loureiro, Rui A.R. Boaventura and Eugénia A. Macedo** (2008). Application of statistical experimental methodology to optimize reactive dye decolourization by commercial laccase. *Journal of Hazardous Materials*, article in press.
- **Terron M.C., Gonzalez T., Carabajo J.M., Yague S., Araha Cuenca A., Tellez A., Dobson A.D.W. and Gonzalez A.E.** (2004). Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fung. Gen. Biol.*: 954-962.
- **Thomas B.R., Yonekura M., Morgan T.D., Czapla T.H., Hopkins T.L. and Kramer K.J.** (1989). A trypsin-solubilized laccase from pharate pupal integument of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry* 19 (7), 611-622.
- **Thurston C.F.** (1994). The structure and the function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19-26.
- **Torres E., Bustos-Jaimes I. and Le Borgne S.** (2003). Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental* 46 (2003) 1–15.
- **Trupkin S., Levin L., Forchiassin F. and Viale A.** (2003). Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 682–690.
- **Tsai H.F., Wheeler M.H., Chang Y.C. and Kwon-Chung, K.J.** (1999). A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Bacteriology* 181 (20), 6469-6477.

- **Tsioulpas, Dimou D., Iconomou D. and Aggelis G.** (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus spp.* in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Biores. Technol.* 84, 251–257.
- **Uyama H. and Kobayashi S.** (2002) - Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers - *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 19-20: 117-127.
- **Valenzuela P., Medina A., Rutter W.J., Ammerer G. and Hall B.D.** (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*, 298, 347-350.
- **Van der Zee F.P. and Villaverde S.** (2005). Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes - a short review of bioreactor studies. *Water Research* 39, 1425–1440.
- **Verstraete W., Wittebolle L., Heylen K., Vanparys B., De Vos P., Van de Wiele T. and Boon N.** (2007). Microbial resource management: the road to go for environmental biotechnology. *Engineering in Life Sciences* 7, 117-126.
- **Vicuña R., González B., Seelenfreund D., Rüttimann C. and Salas L.** (1993). Ability of natural bacterial isolates to metabolize high and low molecular weight lignin-derived molecules. *J Biotechnol* 30, 9–13.
- **Wood D.A.** (1980). Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.*, 11: 327-338.
- **Wosilait W.D., Nason A. and Terrell A.J.** (1954). Pyridine nucleotide-quinone reductase. *J. Biol. Chem.* 206, 271–282.
- **Xu F., Berka R.M., Wahleithner J.A., Nelson B.A., Shuster J.R., Brown S.H., Palmer A.E. and Solomon E.I.** (1998). Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochem. J.* 334 (1998), 63–70.
- **Xu F., Deussen H.J.W., Lopez B., Lam L. and Li K.** (2001). Enzymatic and electrochemical oxidation of N-hydroxy compounds: redox potential, electron-transfer kinetics, and radical stability. *Eur. J. Biochem.* 268, 4169–4176.
- **Xu F., Kulys JJ., Duke K., Li K., Krikstopaitis K., Deussen H.J.W., Abbate E., Galinyte V. and Schneider P.** (2000). Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Appl. Environ. Microbiol* 66, 2052–2056.
- **Xu F., Palmer A.E., Yaver D.S., Berka R.M., Gambetta G.A., Brown S.H. and Solomon E.I.** (1997). Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase. *J. Biol. Chem.* 274 (1999), 12372–12375.
- **Xu, F.** (1997). Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J. Biol. Chem.* 272, 924-928.
- **Yamazaki H.I.** (1969). The cuticular phenoloxidase in *Drosophila virilis*. *Journal of Insect Physiology* 15, 2203–2211.

- **Yamazaki H.I.** (1972). Cuticular phenoloxidase from the silkworm, *Bombyx mori*: properties, solubilization, and purification. *Insect Biochemistry* 2, 431–444.
- **Yaropolov A., Skorobogat'ko O., Vartanov S., Varfolomeyev S.** (1994). Laccase : properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem Biotechnol* 49: 257-280.
- **Yaver D. S., Xu F., Golightly E. J., Brown K. M., Brown S. H., Rey M. W., Schneider P., Halkier T., Mondorf K. and Dalboge H.** (1996). Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 834-841.
- **Yoshitake A., Katayama Y., Nakamura M., Iimura Y., Kawai S. and Morohoshi N.**(1993) N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. *J.Gen. Microbiol.* 139, 179-185.
- **Youn H.D., Kim K.J., Maeng J.S., Han Y.H., Jeong I.B., Jeong G., Kang S.O. and Hah Y.C.** (1995). Single electron transfer by an extracellular laccase from the white rot fungus *Pleurotus Ostreatus*. *Microbiology* 141, 393–398.
- **Zhao J., Kwan H.S.** (1999). Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes* *Applied and Environmental Microbiology* 65 (11), 4908-4913.
- **Zille A., Tzanov T., Gu'bitz G.M. and Cavaco-Paulo M.** (2003). Immobilized laccase for decolourization of reactive black 5 dyeing effluent. *Biotechnol Lett* 25,1473-1477.
- **Zollinger H.** (1991). Some thoughts on innovative impulses in dyeing research and development. *Text. Chem. Color.* 23, 19–24.

7 - PUBBLICAZIONI E COMUNICAZIONI A CONVEGNI

CHIARA COLAO, CARLO CAPORALE, **FEDERICA SILVESTRI**, MAURIZIO RUZZI AND VINCENZO BUONOCORE. Modeling the 3-D structure of a recombinant laccase from *Trametes trogii* active at pH close to neutrality - Submitted for publication on *Journal of Protein Chemistry*

SILVESTRI F., BUONOCORE V, RUZZI M, COLAO MC, GARZILLO A. (2007). Effect of native and recombinant laccases on decolourization of synthetic dyes. 3rd INTERNATIONAL CONFERENCE - EZYMES IN THE ENVIRONMENT: Activity, Ecology and Applications. 15-19 Luglio 2007.

COLAO MC, RUZZI M, **SILVESTRI F.**, GARZILLO AMG, BUONOCORE V. (2007). The Treatment Of Industrial Effluents By Laccases From White-Rot Fungi. ITALIC4 - SCIENCE & TECHNOLOGY OF BIOMASSES: ADVANCES AND CHALLENGES. 8-10 Maggio 2007.

GARZILLO AMG, **SILVESTRI F.**, COLAO MC, RUZZI M, BUONOCORE V. (2006). Phenols and Dyes Degradation by an Immobilized Laccase from *Trametes trogii*. 3rd European Meeting in Oxizymes. September, 7-9, 2006.